

**Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803).
“Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica”**

**Susana Nóvoa Vázquez
2007**



**Metabolismo lipídico, ácidos grasos
en el cultivo larvario de almeja
babosa, *Venerupis pullastra*
(Montagu, 1803). “Calidad ovocitaria,
larvaria y nutricional con una
aproximación al uso de la
microencapsulación lipídica”**

SUSANA NÓVOA VÁZQUEZ

2007



XUNTA DE GALICIA
**CONSELLERÍA DE PESCA
E ASUNTOS MARÍTIMOS**



**UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA**
**Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular**



CIMA

CENTRO DE
INVESTIGACIÓN
MARIÑAS



**XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE PESCA
E ASUNTOS MARÍTIMOS
DIRECCIÓN XERAL DE RECURSOS MARIÑOS**

TESIS DOCTORAL

**Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja
babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). "Calidad ovocitaria,
larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la
microencapsulación lipídica"**

Memoria presentada por

SUSANA NÓVOA VÁZQUEZ

Para optar al grado de Doctora en Biología

Santiago de Compostela, 2007

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular – Campus de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA: que la presente memoria titulada: **Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja boba, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). “Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica”** llevada a cabo por Dña. Susana Nóvoa Vázquez, ha sido realizada bajo mi dirección.

Creyendo que el mencionado trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del grado de Doctora.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Lugo a 2007.

Fdo: Dr. José Luis Rodríguez Rodríguez

Las investigaciones presentadas en esta tesis han sido realizadas en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, dependiente del Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA) de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, dentro del marco de los Proyectos de Investigación financiados por la propia Consellería.

También forman parte de Proyectos financiados por otras entidades:

-“Utilización de la alimentación artificial en el estudio de las necesidades esenciales en ácidos grasos durante el desarrollo larvario de bivalvos marinos”. CICYT (MAR96-1876)

-“Estudio del acondicionamiento de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* L: Influencia de factores externos e internos”. PGIDT (PGIDT00-MAR23501 PR)

-“Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas”. JACUMAR

A os meus pais pola mellor herdanza que me
puideron deixar: a oportunidade de coñecer e
aprender cada día máis da vida.

Vindo de Ourense podo facer miña parte da
letra dunha canción de Madredeus:

“Cando vin ó lonxe o mar
alí fiquei parada o ver.
Cando vin o mar, sen querer,
deixeme alí quedar”.

Viejita... ya está.
Ya terminé “eso” que estaba haciendo y, los
negocios... bien, como siempre.

Agradecimientos

Cuando me decidí a realizar este trabajo, me subí a un carro repleto de fuerza que circulaba por un camino llano y lleno de ilusión. Los años fueron pasando y el carro se fue cargando de pequeños problemas, de cansancios y además el camino se hizo pesado, a veces incluso, de difícil andar. Sin embargo, ya sabía entonces que tendría a alguien que me ayudaría a tirar de él, que tendría quien me apoyara para no volcar con él y que tendría quien me empujara cuando las fuerzas disminuyeran o la pendiente fuera dura.

Este apartado de la tesis es, curiosamente, el último que hago, el que dejo para el final. Con él no sólo quiero cumplir con la parte tradicional y casi "burocrática" que supone la presentación de una tesis como acto académico, sino que también quiero expresar mi más sincero reconocimiento a los méritos de muchas personas que, de una forma u otra, están en estos momentos, en los que escribo, en mi mente y en mi recuerdo.

Por este motivo, en esta carilla de la hoja expongo unos agradecimientos que de ley deben de ser valorados. Pero al dorso expreso los míos, "mis agradecimientos" y desde luego, a mi manera.

Agradezco a mi director de tesis, al profesor José Luís Rodríguez Rodríguez, no sólo su dirección sino también su colaboración directa en la elaboración. Le agradezco su esfuerzo por enseñarme el complejo mundo lipídico y de los ácidos grasos, su paciencia por intentar domar mi espíritu, un tanto rebelde, que reflejaba las prisas de terminar cuanto antes. Sobre todo es de agradecer su capacidad de búsqueda de nuevas explicaciones a las cosas y ante todo, su búsqueda de la perfección.

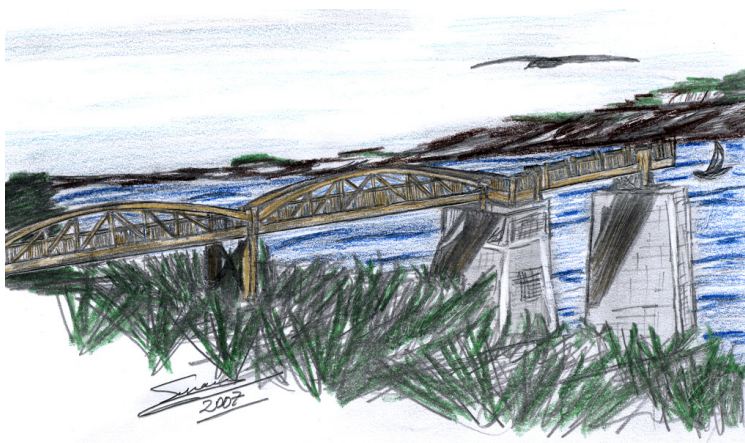
A la Dra. Dorotea Martínez Patiño, no le agradezco, la culpa directamente porque ella me metió de lleno en el mundo de la acuicultura que, como afirmó un día, no consiste en fabricar tornillos y por eso, se debe investigar sobre la forma de solucionar todos los problemas que surgen. Le agradezco su confianza en mí desde el primer momento y por supuesto, la gran oportunidad que me dio siempre de ampliar las posibilidades de mi vida profesional en la investigación.

Mis Agradecimientos

Está claro que no soy la escritora Isak Dinesen. Dejo también muy claro que no soy Meryl Streep interpretando a la baronesa Karen, que llega a África (Kenia) desde Dinamarca, para sumergirse en la gran aventura de cultivar café, con la estimable ayuda de la tribu Kikuyu que vivía en aquel hermoso lugar. Por lo tanto, yo no puedo empezar mi cuento con la frase tan famosa de: "Yo tenía una granja en África, al pie de las colinas de Ngong...".

Yo sólo intento escribir, a mi humilde manera, el apartado de "mis agradecimientos" en este manuscrito al que llaman tesis. Soy de Ourense (lugar sin mar) y llegué a Ribadeo para ocupar una plaza en el Centro de Cultivos Marinos (antiguo plan marisquero). Mi aventura consistió en intentar cultivar bivalvos marinos y, de la tribu que me encontré en este pintoresco lugar, hablaré a continuación. Desde luego, yo tendré que empezar mi cuento escribiendo: "Yo tenía un criadero en Ribadeo, a orillas de la Ría de Ribadeo...".

Mi tribu, la gente que me ayudó a conducir el carro para poder terminar este trabajo y que día a día trabajan conmigo cultivando, administrando papeles e investigando, está formada por personas con una personalidad y características, desde luego, muy dispares. Quiero nombrarlas una a una y renombrarlas con las expresiones cariñosas que me sugieren al recordarlas. Gracias a: Alicia (Mi má/Voz clara); Ana Cruzado (La memoria); Ana Cerviño (Arco Iris); Andrea (Río que fluye); Conchita (Brisa fresca/Río manso); Diana (Dulce niña); Dorotea (Estrella Polar); Fiz (Pequeño gran hombre); Javier (El primero en el baile); José Ma (El que es habilidoso); Justa (Risa alegre); María José (Canto de jilguero); Menel (Pájaro de nieve); Mercedes (Siempreno); Merche (Hoja verde); Viki (Gota de Rocío)... No pongo "y" y termino con puntos suspensivos, porque algunos emigraron (Emi, Raquel, Miryan, Manu, Miguel, Nel, María...) y otros están llegando (Toño, Sari,...).



Al final, cuando Karen tiene que marchar, deja a un lado su carácter orgulloso y se postra de rodillas delante de una alta personalidad, para apelar por aquellas gentes que la ayudaron y le enseñaron tanto en los días compartidos. Yo he solicitado el poder defender este nuestro trabajo a orillas de la Ría

de Ribadeo, tal como va la burocracia no tengo mucha confianza en lograrlo pero, allá en donde la defienda, es más, allá en donde esté, siempre habrá una "Memorias de Ribadeo" en mi cabeza.

Para la banda sonora, dejo que suene la Real Banda de gaitas de Ourense que me trasladan a mi origen (al principio de los principios)... a mi familia. Para ellos no tengo palabras, no tengo adornos, sólo tengo "latidos". Y para Lúa..., mejor me lo guardo.

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN	1
 1.- ALMEJA BABOSA, <i>Venerupis pullastra</i> : DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	 3
1.1.- Clasificación, Hábitat y Distribución	3
1.2.- Biología de la especie	4
1.2.1.- Organismo adulto	4
1.2.2.- Ciclo Biológico	8
 1.3.- Comercialización y Producción en Galicia	 13
1.4.- Planes de explotación y métodos de pesca de <i>V. pullastra</i> en Galicia	16
1.5.- Interés comercial de la especie como fuente de $\omega 3$	19
 2.- CULTIVO EN CRIADERO	 20
2.1.- Acondicionamiento de reproductores e inducción a la puesta	21
2.2.- Cultivo larvario, metamorfosis y cultivo postlarvario	22
2.3.- Preengorde y engorde	23
2.4.- Alimentación	24
2.4.1.- Alimento vivo: microalgas marinas	25
2.4.2.- Alimento artificial: microencapsulación	28

3.- IMPORTANCIA DE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS	29
3.1.- Los lípidos	30
3.1.1.- Definición, clasificación y funciones	30
3.2.- Los ácidos grasos	33
3.2.1.- Definición, nomenclatura y clasificación	33
3.2.2.- Metabolismo de los ácidos grasos en bivalvos marinos	35
3.2.2.1.- Biosíntesis de ácidos grasos	35
3.2.2.2.- β -oxidación de ácidos grasos	43
4.- PLAN DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN	45
4.1.- Plan de trabajo	45
4.2.- Justificación	47
4.2.1.- Los ácidos grasos como combustibles y sillares estructurales en el estadio de vida larvaria lecitotrófica	47
4.2.2.- Los ácidos grasos como combustibles y sillares estructurales en el estadio de vida larvaria planctotrófica	50
II.- OBJETIVOS	51

	ÍNDICE
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	55
1.- CULTIVOS	57
1.1.- Cultivo larvario y postlarvario	57
1.2.- Cultivo de microalgas	61
2.- EMPLEO DE MICROCÁPSULAS	62
2.1.- Fabricación de las microcápsulas	62
2.2.- Ensayos con las microcápsulas	64
2.2.1.- In Vitro	64
2.2.2.- In Vivo	66
3.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	69
3.1.- De microalgas	69
3.2.- De larvas y postlarvas	70
3.3.- De microcápsulas	71
4.- TOMA DE DATOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LOS CRECIMIENTOS, CÁLCULO DE DENSIDADES Y PRODUCCIONES	71
5.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS ALMACENADAS Y EXPRESIÓN DE LOS DATOS	73
6.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS	74

7.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	75
7.1.- Método	75
7.1.1.- Cromatografía SPE (Solid phase extractive)	75
7.1.2.- Metilación	76
7.1.3.- Análisis por cromatografía en fase gaseosa	77
7.2.- Principales ácidos grasos identificados	81
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
1.- DESARROLLOS LARVARIOS	85
1.1.- Calidades de la puesta	85
1.1.1.- Rendimiento y características de una puesta estándar	85
1.1.2.- Rendimientos y características de las puestas estudiadas	86
1.2.- Calidades de los desarrollos larvarios	89
1.2.1.- Crecimiento y rendimiento en una puesta estándar	89
1.2.2.- Crecimiento y rendimiento en las puestas estudiadas	91
1.3.- Calidad del alimento	96
1.3.1.- Datos en proteínas y ácidos grasos de las especies fito-planctónicas utilizadas habitualmente como alimento	96

1.3.2.- Calidad de las dietas microalgales empleadas en los cultivos larvarios estudiados	101
1.3.2.1.- Composición en proteínas y su relación con el crecimiento observado en los cultivos buenos y malos	103
1.3.2.2.- Composición en ácidos grasos y su relación con el crecimiento observado en los cultivos buenos y malos	104
2.- EVOLUCIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS CULTIVOS LARVARIOS ESTUDIADOS	109
2.1.- Datos biométricos y de ácidos grasos en las etapas a analizar	109
2.2.- Estadío de vida lecitotrófica. Paso de ovocitos fecundados a larva D	111
2.2.1.- Estrategia en almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	116
2.2.1.1.- Capacidad de biosíntesis de ácidos grasos en la fase de vida lecitotrófica	118
2.2.1.2.- Capacidad de bioconversión de ácidos grasos en la fase de vida lecitotrófica	119
2.2.2.- Estrategia en vieira (<i>Pecten maximus</i>)	125
2.3.- Estadío de vida mixotrófica	128
2.4.- Estadío de vida planctotrófica	129
2.4.1.- Comportamiento de la larva veliger temprana	129
2.4.1.1.- Estrategia en almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	133
2.4.1.2.- Estrategia en vieira (<i>Pecten maximus</i>)	139

2.4.2.- Comportamiento de la larva veliger	140
2.4.2.1.- Estrategia en almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	146
2.4.2.2.- Estrategia en vieira (<i>Pecten maximus</i>)	148
2.4.3.- Comportamiento de la postlarva	153
2.4.3.1.- Estrategia en almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	156
2.4.3.2.- Estrategia en vieira (<i>Pecten maximus</i>)	157
3.- EXPERIENCIAS CON LAS MICROCÁPSULAS	160
3.1.- In Vitro	160
3.2.- In Vivo	169
V.- APÉNDICE	187
1.- TABLAS	189
1.1.- ALMEJA BABOSA	189
1.1.1.- Ovocito	189
1.1.1.1.- Lípidos Polares	189
1.1.1.2.- Lípidos Neutros	191
1.1.2.- Larva D	193
1.1.2.1.- Lípidos Polares	193
1.1.2.2.- Lípidos Neutros	195

	ÍNDICE
1.1.3.- Larva veliger temprana (6-8 Días)	197
1.1.3.1- Lípidos Polares	197
1.1.3.2- Lípidos Neutros	199
1.1.4.- Larva Pediveliger (15-22 Días)	201
1.1.4.1.- Lípidos Polares	201
1.1.4.2.- Lípidos Neutros	203
1.1.5.- Postlarva (22-28 Días)	205
1.1.5.1.- Lípidos Polares	205
1.1.5.2.- Lípidos Neutros	206
1.2.- VIEIRA	207
1.2.1.- Lípidos Polares	207
1.2.2.- Lípidos Neutros	208
2.- PUBLICACIÓN	209
VI.- CONCLUSIONES	219
VII.- BIBLIOGRAFÍA	223

ABREVIATURAS

*AA, AAD ₈	Ácido araquidónico deuterado
*AAGAM	Microcápsulas GAM con *AA y aceite de oliva
AC	Ácido
ACAT	Colesterol aciltransferasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácido graso sintetasa
AGSA	Ácidos grasos saturados
AGTs	Ácidos grasos totales
AHB	Aceite de hígado de bacalao
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemist Society
ARA	Acido araquidónico
BSI	British Standard Institution
C	Cultivo
CG (GC)	Cromatógrafo de gases
CIMA	Centro de Investigaciones Marinas
CoA	Coenzima A
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DHA	Ácido docosahexaenoico
D1	Dieta 1
D2	Dieta 2
DI	Diámetro interno
EFA _s (EFA)	Ácidos grasos esenciales
Elong	Elongación
EPA	Acido eicosapentaenoico
FAME _s	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAS	Fatty acid synthetase
FID	Detector de ionización de llama
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAM _s (GAM)	Microcápsulas de gelatina acacia

HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HUFAs	Ácidos grasos altamente insaturados
Hv	Huevo (Ovocito)
ISO	Internacional Standards Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Ácido linoleico
LCE	Elongasa de cadena larga
LN	Lípidos neutros
LNA	Acido linolénico
LP	Lípidos polares
Lv	Larva
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
NMI	No metilen interrumpidos
NMIFAS	Ácidos grasos no metilen interrumpidos
OB	Eje menor
OL	Eje mayor
p. ej.	Por ejemplo
PS	Peso seco
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
SAFAs	Ácidos grasos saturados
SCD	Estearoil-CoA desaturasa
SD	Desviación estándar
SPE	Solid phase extractive
Tot.	Totales
UV	Luz ultravioleta
VIS	Luz visible
μcáp	Microcápsulas
Σ	Suma
Δ	Delta. Diferencia

I.-INTRODUCCIÓN

I.-INTRODUCCIÓN

1.- ALMEJA BABOSA, *Venerupis pullastra*: DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

1.1.- Clasificación, Hábitat y Distribución

La almeja babosa, es un molusco lamelibranquio perteneciente a la familia Veneridae cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

➤ PHYLUM	MOLLUSCA
➤ CLASE	BIVALVIA
➤ SUBCLASE	HETERODONTA
➤ SUBORDEN	VENEROIDA
➤ SUPERFAMILIA	VENEROIDEA
➤ FAMILIA	VENERIDAE
➤ GÉNERO	<i>Venerupis</i>
➤ ESPECIE	<i>pullastra</i> (Montagu, 1803)

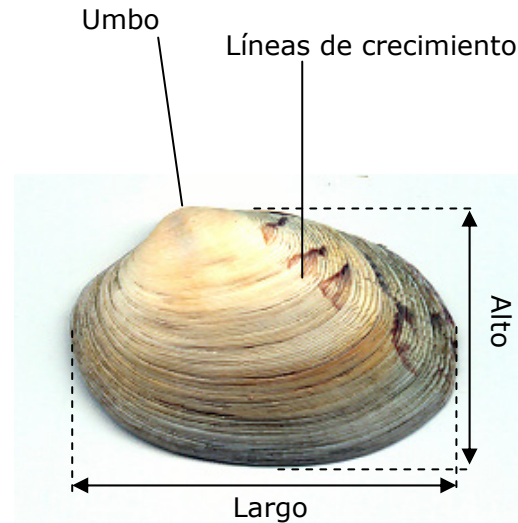
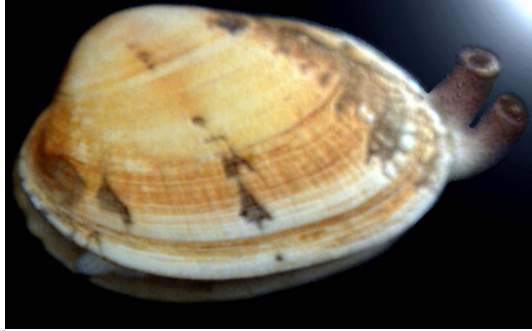
La almeja babosa, es una especie del litoral que vive enterrada en bancos localizados en zonas intermareales o submareales. Al presentar sifones más cortos que otras especies de almeja, no puede enterrarse tanto, resistiendo muy mal los períodos de desecación de la bajamar.

Se distribuye por Europa desde el norte, Noruega, el Mar Báltico y el Mar del Norte, Inglaterra, Irlanda, el Mar Cantábrico y Atlántico español, Portugal, alcanzando el sur, hasta Marruecos. Al este se distribuye por el Mar Mediterráneo (Argelia, Túnez, Italia, Grecia y Egipto) hasta el Mar Rojo sin alcanzar el Mar Negro (Marsh, 1966, Fischer-Piette y Metivier, 1971).

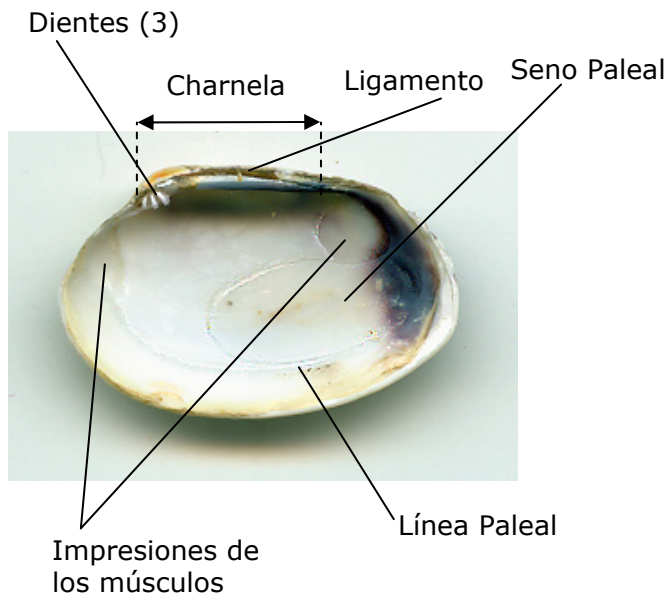
En Galicia, puede ocupar nichos ecológicos con especies muy similares algunas autóctonas, tales como la almeja fina (*Tapes decussatus*), la almeja rubia (*Venerupis rhomboides*, Pennant, 1777), la almeja bicuda (*Venerupis aurea*) y otras introducidas como la almeja japonesa (*Tapes philippinarum*).

1.2.- Biología de la especie

1.2.1.- Organismo adulto



Su concha está formada por dos valvas iguales, unidas por un ligamento (charnela) que posibilita su apertura y cierre. Es ovalada y ligeramente alargada. La superficie externa está surcada por líneas concéntricas muy marcadas paralelas al borde mientras que, las líneas radiales son imperceptibles a diferencia de otras especies.



En la superficie interna de las valvas se encuentran las dos inserciones de los músculos abductores. También se observa la línea paleal, impresión dejada por el reborde del manto y que, en la región anterior, presenta un seno paleal a nivel de los sifones.

Las valvas encierran el cuerpo del animal (Figura 1) constituido principalmente por: masa visceral (con los órganos viscerales) y los órganos no viscerales que incluyen el manto, los sifones, el pie y las branquias.

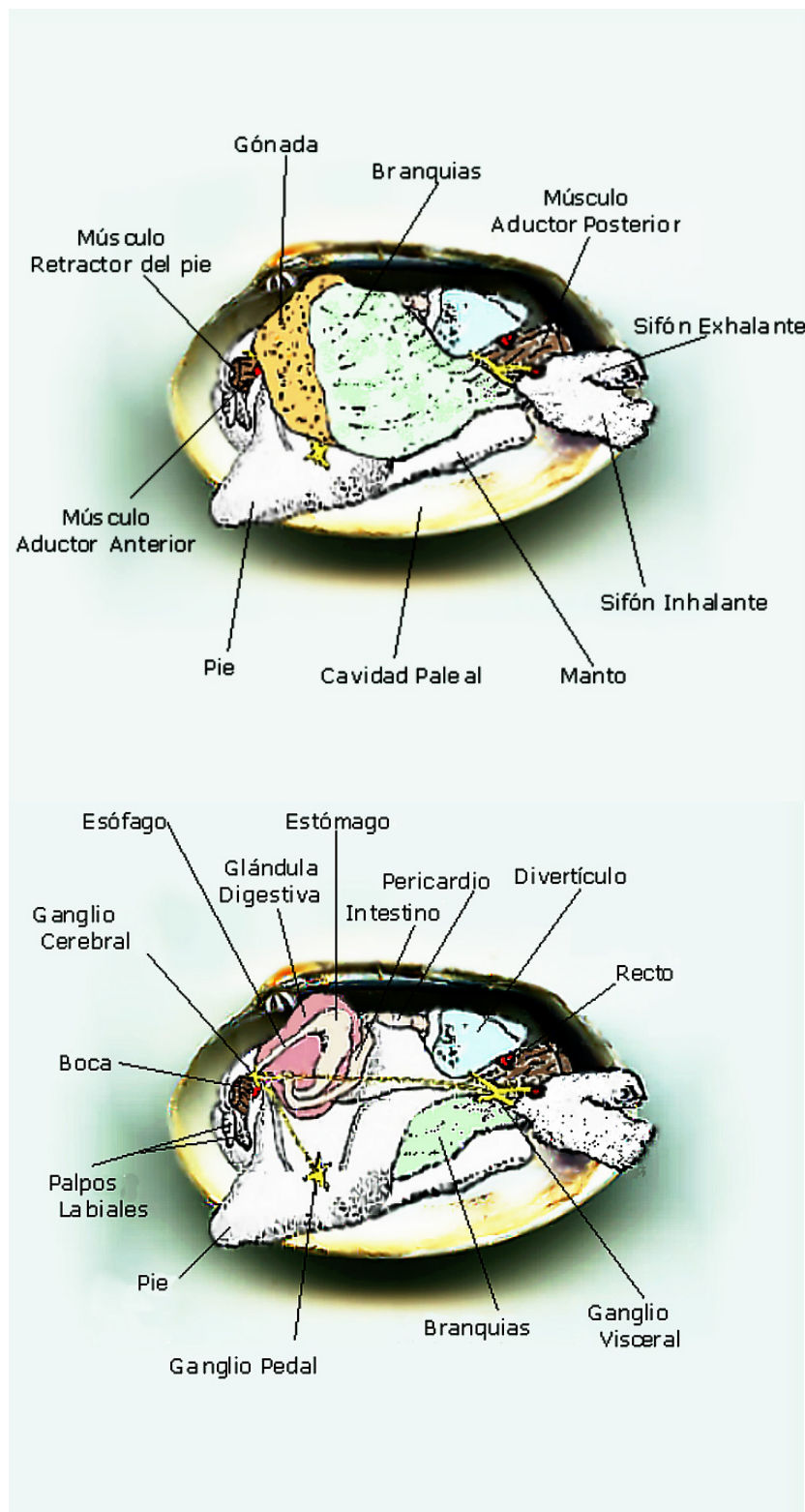


Fig. 1: Representación del cuerpo de *Venerupis pullastra*.

En la **masa visceral** se encuentra el aparato digestivo, el sistema circulatorio, el aparato reproductor y el sistema nervioso.

➤ **El aparato digestivo** está formado por la boca, esófago, estómago, intestino, recto y ano. La glándula digestiva envuelve el esófago, estómago y parcialmente el intestino. Las partículas alimenticias son atrapadas por el mucus secretado por el manto y las branquias. Los cilios, presentes en ambas estructuras, dirigen estas partículas hacia la boca, rodeada de unas extensiones que son los palpos labiales, capturándolas para llevarlas al estómago. Si las partículas ingeridas son demasiado grandes, pueden ser excretadas por el mismo esófago formando las denominadas pseudo-heces. Una vez asimilado el alimento, las heces circulan vía intestino recto y desembocan en el ano, muy próximo a los sifones.

➤ **El sistema circulatorio** es abierto. Está formado por el corazón, con dos ventrículos y un atrio rodeados por el pericardio, colocado en posición dorsal. De los ventrículos salen una aorta anterior y otra posterior que recorren el organismo. Del atrio salen vasos venosos hacia las branquias, manto y pie.

➤ **El sistema nervioso** lo forman tres pares de ganglios conectados entre sí por un cordón neuronal. Un par cerebral a ambos lados del esófago y próximos a la boca, un par pedal que inervan el pie y un par visceral que inervan el músculo aductor posterior.

➤ Existe también un **sistema excretor** constituido por un sistema renal sencillo y una **glándula del viso** que secreta un filamento que le permite fijarse al sustrato, siendo más funcional en estadios juveniles.

➤ **El aparato reproductor** lo constituye una gónada que, en reposo sexual se caracteriza por ser una estructura difusa que desaparece prácticamente y que, en su estado de máximo desarrollo, envuelve la glándula digestiva ocupando toda la masa visceral. La gónada se diferencia sexualmente en la gametogénesis liberando ovocitos o espermatozoides en función del sexo del progenitor.

Según trabajos desarrollados en el Centro de Cultivos Mariños (CIMA) de Ribadeo, por Cerviño Otero, 2005 (DEA), la almeja babosa en Galicia presenta un amplio período de madurez sexual y puesta que abarca principalmente los meses comprendidos entre febrero y junio, observando un pico de máxima puesta en el mes de abril, que es cuando se produce un descenso en el Índice de Condición. Siempre presenta gametos maduros no atrésicos durante todo el año, con posibilidad de generar reclutamientos naturales continuados y de obtener puestas en criadero en cualquier época del año.

El **manto** es un pliegue laminar que envuelve a todo el animal. Está constituido por dos lóbulos unidos en la parte dorsal y que, hacia la región posterior forman los sifones (uno inhalante y otro exhalante), soldados entre sí, que es una característica de esta especie.

Las **branquias** tienen forma típicamente laminar y están en número de dos situadas a ambos lados de la masa visceral. Tienen una doble misión, alimenticia y respiratoria. Están recorridas por vasos sanguíneos muy finos para permitir el intercambio de gases.

Por último el **pie**, órgano musculoso bien desarrollado, con el que se entierran en el sustrato y mantienen su posición.

1.2.2.- Ciclo Biológico

Un bivalvo sufre grandes transformaciones en sus estructuras a lo largo de su vida, lo que permite distinguir los siguientes estados: perizigótico, término propuesto por Lucas (1980) y que designa al período que va desde la meiosis ovocitaria hasta el estado de segmentación de 8 blastómeros; embrionario, hasta la formación de la larva trocófora; larvario, hasta la metamorfosis y postlarvario, cuando alcanzan la apariencia definitiva con distintos tamaños (juvenil y adulto).



Fig. 2: Los estadios del desarrollo en bivalvos y su agrupación de acuerdo a diferentes criterios.

Como se representa en la Figura 2, estos estados se pueden agrupar de acuerdo a diferentes criterios (Lucas, 1984). Si se considera el modo de vida, los tres primeros estados, que son pelágicos, se oponen a los otros tres, que son bentónicos. Si se tiene en cuenta la morfología del organismo en los diferentes estados de desarrollo, la fase postlarvaria se diferencia de las dos siguientes por el hecho de que todavía no ha adquirido las estructuras definitivas de la especie considerada. Así, los estados juvenil y adulto constituyen el imago (Lucas, 1984) y representan la fase imaginal, mientras que los anteriores, la llamada fase preimaginal.

El ciclo biológico de estos individuos comienza una vez que su gónada ha alcanzado el máximo desarrollo y las células sexuales adquieren su completa madurez y por lo tanto, tiene lugar la expulsión de los gametos.

En la Figura 3 se esquematiza el ciclo desde la fecundación hasta postlarva.

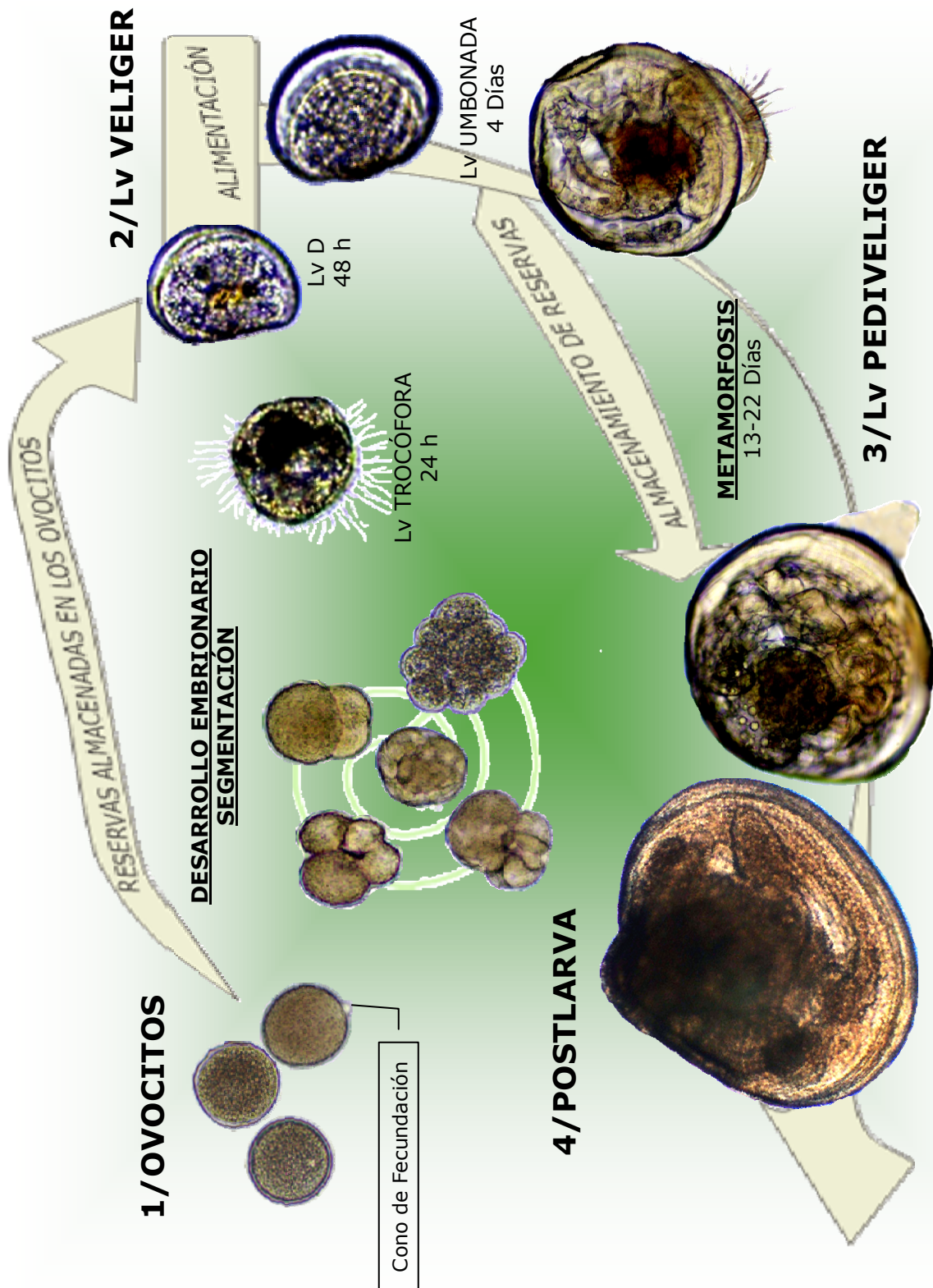


Fig. 3: Representación del ciclo biológico de *Venerupis pullastra*. Fases del desarrollo larvario desde ovocito fecundado hasta postlarva y sus estrategias de utilización de reservas y alimentación exógena.

1.- FECUNDACIÓN

Se trata de una especie, como se ha dicho anteriormente, dioica que emite sus gametos en el agua, produciéndose la fecundación de los huevos de forma externa.

Después del desove, el esperma se aproxima y enlaza la superficie de los ovocitos teniendo lugar la reacción acrosomal, produciéndose la fusión de los gametos. En el punto donde tiene lugar esta unión, se forma una profusión del citoplasma del ovocito, que rodea al espermatozoide y que recibe el nombre de cono de fecundación.

2.- DESARROLLO EMBRIONARIO

Comienza con la reacción acrosomal y consiguiente fusión de los gametos.

En general, la segmentación de los ovocitos fecundados en moluscos bivalvos, es de tipo espiral dando lugar a una gástrula, que se transformará en una larva trocófora de vida libre y natatoria.

Toda la serie de cambios que ocurren durante el desarrollo embrionario hasta la formación de los primeros estadios larvarios, tiene lugar a expensas de las reservas almacenadas en el ovocito durante la vitelogénesis.

3.- DESARROLLO LARVARIO

LARVA TROCÓFORA

El estadio de larva trocófora, primera forma de vida larvaria y natatoria, comienza a las 20 horas aproximadamente después de la fecundación. Se caracteriza por la formación de dos estructuras importantes. Una corona de cilios denominada prototroca (órgano locomotor) que será el precursor del velo y la glándula de la concha, que se encarga de secretar la primera

concha larvaria o prodisoconcha I, recubriendo paulatinamente el cuerpo de la trocófora.

LARVA VELIGER

La transformación de la prototroca en el velo y la secreción completa de las dos conchas específicas de los bivalvos adultos, conduce a la larva veliger, primera forma de larva planctotrófica reconocible.

La formación de la larva D se lleva a cabo en un período de tiempo entre las 30 y las 48 horas desde la fecundación del ovocito.

A medida que la larva veliger va creciendo adquiere diferentes morfologías:

- **Larva D**, la primera forma de larva veliger, se caracteriza por presentar una charnela recta que une las dos valvas prodisoconcha I lisas, adquiriendo la morfología que le da su nombre.

- **Larva umbonada o veliconcha**, provista de la prodisoconcha II secretada por el manto, con ornamentación ya patente y presencia del umbo debido a la curvatura de la charnela, antes recta. Esta fase aparece a los 4 días y finaliza a los 13-22 días con la formación de la larva pediveliger.

Lo que caracteriza esta etapa de vida larvaria es el velo, órgano que le permite captar el alimento. Este es transportado de la boca al esófago y de ahí al estómago donde, por medio del estilo cristalino, se trituran las partículas alimenticias con las enzimas que él mismo libera. Posteriormente pasan a la glándula digestiva, que segrega nuevas enzimas, para realizar la digestión intracelular. Una vez asimilados los nutrientes y después de atravesar el intestino, se eliminan las heces por el ano.

LARVA PEDIVELIGER

La fase de vida pediveliger se corresponde con una etapa de transición donde coexiste una vida natatoria, característica del estado larvario (con velo), y una vida sedentaria, sésil o con escasa capacidad de movimiento, típica del estado adulto (con pie).

Este período finaliza cuando la larva se encuentra lista para la metamorfosis siendo el acúmulo de reservas, principalmente lipídicas, uno de los factores desencadenantes del proceso (Holland y Spencer, 1973).

En esta especie se alcanza esta etapa aproximadamente a los 15 días con una talla de 230-250 μm .

4.- METAMORFOSIS

En función de como haya ido el desarrollo larvario, entre los 13 y 22 días, tiene lugar la metamorfosis caracterizada por la desaparición del velo y la aparición del pie, pasando de ser un organismo pelágico a un organismo bentónico, con los rasgos y características de un organismo adulto.

Ello conlleva que la función del velo, como órgano natatorio-alimenticio, pase a recaer en las branquias y los sifones, los cuales, captan el oxígeno disuelto en el agua y atrapan las partículas alimenticias, arrastrándolas hacia la boca por medio de los cilios presentes tanto en las branquias como en los bordes del manto.

La superación de la metamorfosis y el tiempo en que se lleve a cabo está relacionado con las reservas energéticas que adquiere y acumula a lo largo de su vida larvaria.

Entre la desaparición de velo y la funcionalidad de las branquias, existe un período de no alimentación, recurriendo el organismo a sus reservas.

5.- DESARROLLO POSTLARVARIO

La etapa de metamorfosis implica reestructuraciones tisulares con la pérdida de algunos órganos y la aparición de otros hasta la consecución de una postlarva.

La postlarva también llamada plantígrado, comienza a adoptar la forma definitiva del adulto, crece alimentándose de los nutrientes del medio marino, desarrollando la concha adulta o disoconcha.

La vida juvenil y la fase adulta es la etapa de semilla en la que el organismo crece y se desarrolla con las estructuras típicas de un individuo adulto.

1.3.- Comercialización y producción en Galicia

Durante el año 2003 el valor de los productos subastados en las lonjas gallegas superó los 330 millones de euros, 228 de los cuales proceden de la venta de pescado (Tabla I).

Tabla I: Producción total pesquera de Galicia en primera venta (Pesca fresca). Resultados acumulados en 2003.

	<i>Cantidad (kg)</i>	<i>Euros</i>
Cefalópodos	7.169.554	22.564.931
Crustáceos	1.411.256	23.623.179
Bivalvos	8.217.116	58.810.467
Gasterópodos	8.280	12.612
Equinodermos	300.762	495.357
Otros invertebrados	28	864
*Peces	107.422.323	228.697.042
Total de la primera venta	124.310.323	334.622.945

Fuente: Anuario de pesca fresca, 2003 (Servicio de Estudios Pesqueros).

Los mariscos bivalvos representaron un volumen próximo a los 60 millones de euros, fruto de las más de 8.300 t subastadas en las lonjas. Concretamente, la almeja babosa supuso un total de 15 millones de euros (1.200 t), como se puede observar en la siguiente Tabla.

Tabla II: Descargas de bivalvos en los puertos gallegos en 2003.

	Kg	% Kg	€	%€	€/ Kg
*Almeja babosa	1.163.298	14,06%	15.608.977	26,40%	13,42
Almeja bicuda	18.460	0,22%	105.710	0,18%	5,73
Almeja fina	731.761	8,85%	16.959.386	28,68%	23,18
Almeja rubia	269.513	3,26%	2.562.931	4,33%	9,51
Almeja japonesa	633.093	7,65%	5.434.712	9,19%	8,58
Berberecho	3.420.427	41,35%	12.717.804	21,51%	3,72
Cadelucha	9.253	0,11%	291.285	0,49%	31,48
Carneiro	78.077	0,94%	474.014	0,80%	6,07
Cornicha	1.376	0,02%	6.058	0,01%	4,40
Longueirón	17.656	0,21%	282.823	0,48%	16,02
Longueirón vello	9.268	0,11%	25.320	0,04%	2,73
Mexilla	124.765	1,51%	122.436	0,21%	0,98
Navaja	83.312	1,01%	1.325.774	2,24%	15,91
Ostra	18.011	0,22%	69.079	0,12%	3,84
Rabioso	7.539	0,09%	17.004	0,03%	2,26
Reló	1.575.906	19,05%	2.548.368	4,31%	1,62
Vieira	62.372	0,75%	363.212	0,61%	5,82
Volandeira	47.505	0,57%	208.162	0,35%	4,38
Total bivalvos	8.271.589	100,00%	59.123.055	100,00%	7,15

Las principales lonjas en descarga de esta especie se representan en la Figura 4 donde también se expone su precio estimado.

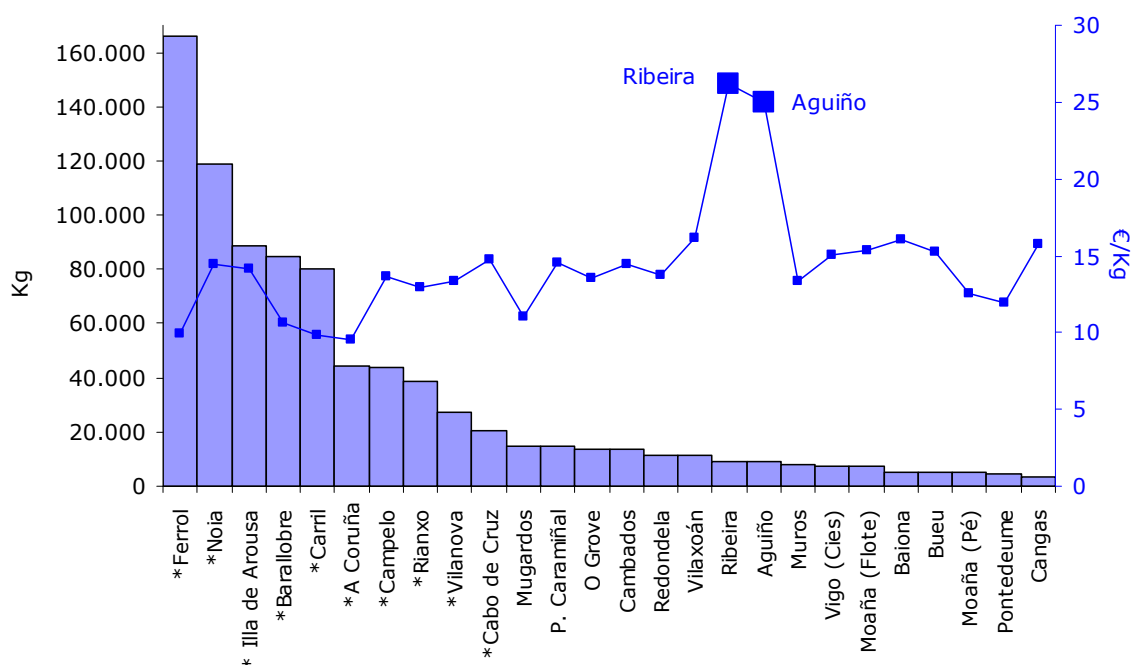


Fig. 4: Principales lonjas en descarga de *V. pullastra* y sus correspondientes precios en el mercado (€/kg). Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.

Pero como se observa en la Figura 5, la evolución de producción de la almeja babosa por pesca extractiva desde 1998 al año 2005, muestra una disminución de hasta el 80 % en el 2004 (524.845 Kg) que se recupera al año siguiente alcanzando los valores anteriores (1.097.165 Kg). Esto trae como consecuencia, variaciones en su precio de mercado (€/kg).

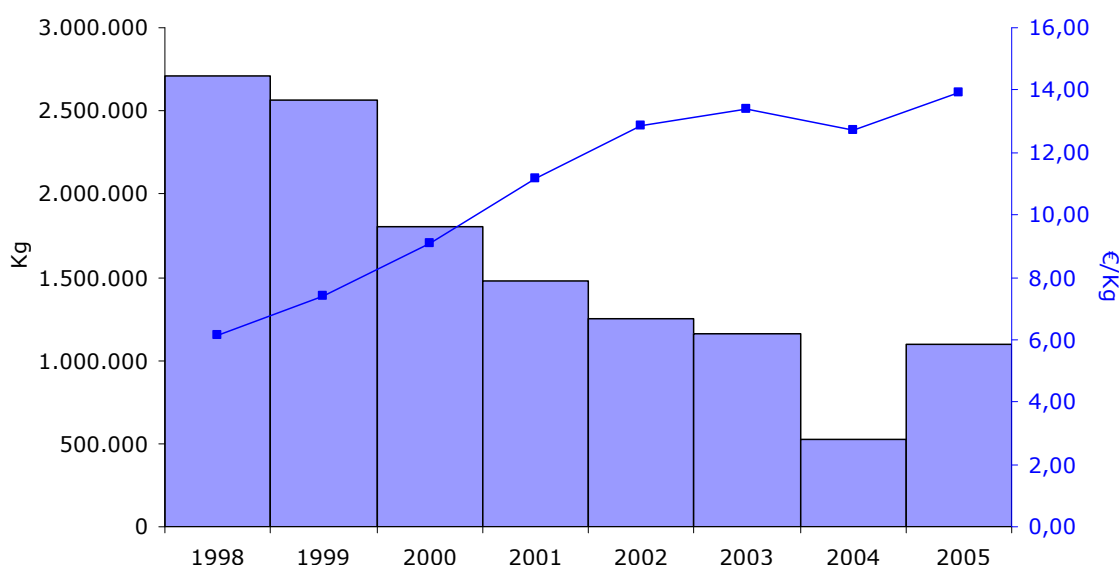


Fig. 5: Evolución de la producción comercial en Kg de la almeja babosa y de su precio (€/kg). Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.

Para poder solventar estas variaciones de descarga en nuestros puertos y de esta forma conseguir el mantenimiento de los precios, se ha recurrido a la acuicultura.

La costa gallega goza de unas condiciones idóneas para la acuicultura gracias, entre otros factores, a la abundancia en fitoplancton, a la temperatura y a la salubridad de las aguas.

Ya desde finales de los años 70, esto permitió el desarrollo de una industria acuícola propia, diversificada y en crecimiento constante. Se trata de un sector con muchas posibilidades de crecimiento a nivel mundial. De hecho, la FAO señala que en el 2003 más de la mitad de los productos marinos consumidos procedían de la acuicultura.

En el año 2003 la acuicultura gallega alcanzó una producción superior a las 258.000 t, dominando el mercado español y siendo uno de los principales suministradores de los mercados europeos. De esta producción, donde es destacable la del mejillón, la almeja babosa tiene una aportación de 128 t (Tabla III).

Tabla III: Producción en acuicultura marina 2003.

	<i>Cantidad (kg.)</i>	<i>Precio (€)</i>
Pulpo	10.240	60.472,94
Almeja babosa	128.266	1.412.285,29
Almeja fina	213.713	3.506.040,03
Almeja japonesa	1.244.864	8.605.292,46
Berberecho	996.915	3.334.940,61
Mejillón	249.956.117	126.011.590,00
Ostra plana	2.073.092	6.069.945,00
Ostra rizada	127.000	177.750,00
Rodaballo	3.141.182	27.307.694,64
Salmón	50.000	150.000,00
Total	257.941.389	176.636.010,97

Fuente: Gestión de establecimientos de cultivos marinos y auxiliares. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.

1.4.- Planes de explotación y métodos de pesca de *V. pullastra* en Galicia

Dado el interés que tiene para Galicia el aprovechamiento de sus recursos naturales, se unificaron y refundieron en un único texto legal las disposiciones existentes al respecto en la Ley 6/1993, del 11 de mayo, de Pesca de Galicia.

En base a esta Ley se dispone, a través del Decreto 423/1993 del 17 de diciembre, que la extracción de marisco y recolección de algas estarán sujetas al Plan General de Explotación Marisquera.

Los Planes Generales de Explotación son un conjunto de normas y orientaciones, de carácter anual, destinadas a regular y programar dicha extracción y recolección que sólo podrá ser ejercida por personas y embarcaciones con permiso de explotación. Serán aprobados por orden de

la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, después de consultar con las entidades representativas del sector.

En estos Planes se integran:

- Planes de explotación para autorizaciones marisqueras, elaborados por sus entidades titulares y presentados en las delegaciones territoriales de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura ajustándose al siguiente esquema: Número de mariscadores y embarcaciones propuesto; períodos y zonas de explotación; número de días previsto de la actividad; normas de comercialización y vigilancia y tope de capturas por especies, por mariscador y por día.

- Normas de explotación para zonas de libre marisqueo, elaboradas de oficio por la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura después de consultar con los representantes del sector. En este caso, puede la Dirección General de Marisqueo y Acuicultura, modificar las especies, períodos y zonas de extracción establecida en las normas.

- Planes específicos de explotación para zonas de libre marisqueo, elaboradas por las cofradías o entidades asociativas del sector ajustándose a los plazos y esquema de los Planes de explotación.

Esta Ley de Pesca también define de una forma amplia la “acuicultura” como la actividad que, llevada a cabo por medios técnicos y científicos, se realiza para obtener y desarrollar especies marinas en sus fases de reproducción, desove, crecimiento, preengorde y engorde.

En las fases de preengorde y engorde podemos incluir otra forma de explotación marisquera:

- Parques de cultivo, espacios situados en la zona marítima o marítimo-terrestre, dedicados especialmente a la almeja fina, babosa y japonesa y que precisan por lo menos, de uno de los siguientes títulos administrativos habilitados por la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura: la concesión o el permiso de actividad.

El tamaño mínimo de comercialización de esta especie está en los 3,8 cm y su extracción puede realizarse mediante rastros y raños de vara, desde pequeñas embarcaciones, o sachos y otras artes cuando el marisqueo es a pie.



Raño



Sacho

Fotos de Ricardo Arnáiz, Alberto de Coo y Juan Manuel Paisal.

1.5.- Interés comercial de la especie como fuente de ω -3

En la actualidad existe una gran preocupación por los contenidos en proteínas y grasas que nos aportan las dietas alimenticias y sobretodo, por los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 entre los que destacan el 20:5(n-3) (EPA) y el 22:6(n-3) (DHA). Esta preocupación ha llevado a realizar numerosos estudios sobre las funciones de estos compuestos y a la valoración de los alimentos que los contienen.

Una de las razones del incremento del aprovechamiento de los moluscos en la alimentación, es su alto valor nutritivo ya que contienen: lípidos, carbohidratos y proteínas en cantidades adecuadas y de fácil digestión. Además son importantes las vitaminas (A, B, C y D) y minerales (calcio y hierro).

Por otro lado las especies marinas se caracterizan por acumular en sus tejidos cantidades relativamente importantes de ω 3, estos ácidos grasos provienen mayoritariamente de su dieta. Su fuente primaria de ω 3 la constituyen una gran diversidad de microorganismos e invertebrados que forman el fito y zooplancton marino.

En consecuencia peces y mariscos tales como: moluscos, crustáceos o cefalópodos, aportan a la dieta humana una gran variedad de ácidos grasos poliinsaturados ω 3.

Dentro de los moluscos la almeja babosa presenta una composición nutricional que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla IV: Valor nutritivo de la almeja babosa en 100 g de peso neto.

Proteínas (g):	10,70
Lípidos (g):	0,50
Grasas saturadas (g):	0,05
Grasas monoinsaturadas (g):	0,03
Grasas poliinsaturadas (g):	0,12
Colesterol (mg):	40
Hidratos de carbono (g):	tr
Calcio (mg):	142
Hierro (mg):	17
Energía (kcal):	47,30

La calidad nutricional de los moluscos bivalvos, concretamente de la almeja babosa, hace que la demanda para su consumo en la alimentación humana sea alta y que vaya en aumento.

Para aumentar la producción no sólo llegaría con los controles legales establecidos, sería necesario su cultivo mediante la acuicultura para satisfacer las demandas del mercado. Su optimización, para la obtención de semilla de buena calidad, es el principal objetivo de este trabajo.

2.- CULTIVO EN CRIADERO

El cultivo de las almejas se originó en Japón, existiendo referencias de que en el siglo VIII se hacían trasvases de almejas de las áreas nativas a otras donde se desarrollaban rápidamente. Este cultivo prosperó, pero se siguen utilizando básicamente los mismos métodos que se aplicaban en el siglo XVIII que fue cuando se estableció formalmente su cultivo.

En Galicia se cultivan, fundamentalmente, tres especies de almejas: la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*).

El cultivo en criadero de larvas de bivalvos ha sido la línea de investigación en moluscos que quizás ha experimentado la progresión más

espectacular a lo largo de los últimos cuarenta años. Los primeros trabajos se iniciaron en los laboratorios de Milford (EE.UU.) por el equipo dirigido por VL Loosanoff, en Conway (Reino Unido) y con los estudios de PR Walne. En general, desarrollaron métodos que potencian las condiciones naturales, sus trabajos esencialmente consistían en determinar los parámetros óptimos que favorecían el éxito del cultivo.

Estos trabajos, recopilados en dos publicaciones (Loosanoff y Davis, 1963; Walne, 1966), obtuvieron resultados reproducibles que permitieron aplicar la tecnología al cultivo de especies de interés comercial y pasar de una escala experimental a un nivel industrial de producción en criaderos.

A pesar de que, desde entonces hasta la actualidad, se ha avanzado en el conocimiento de las condiciones que posibilitan el éxito en los cultivos, los criaderos comerciales de bivalvos se han encontrado con toda una serie de problemas de naturaleza patológica, ecofisiológica y genética entre otras.

Estos problemas provocan un cuello de botella que hay que resolver puesto que, hoy en día, los criaderos de moluscos intentan producir abundante semilla de estas especies, lo que va a suponer una garantía de suministro en cantidad y calidad que permitan al cultivador una correcta planificación de sus ciclos de producción.

Las principales etapas del cultivo de la almeja babosa se describen a continuación:

2.1.- Acondicionamiento de reproductores e inducción a la puesta

El acondicionamiento consiste en mantener a los progenitores en unas condiciones ambientales adecuadas dentro del criadero para conseguir adelantar la madurez sexual y ampliar los períodos de puesta de gametos. Las condiciones o factores ambientales más importantes sobre los que

generalmente se inciden son: la temperatura, la alimentación y el fotoperíodo.

La emisión de los gametos puede ser provocada por diversos procedimientos que engloban entre otros: choques físicos (la variación de la temperatura), la adición de gametos del sexo contrario y el uso de productos químicos como la serotonina (Le Pennec, 1981). No obstante, es importante resaltar que la efectividad de estas técnicas está relacionada con el grado de madurez sexual de los reproductores de manera que, son inoperantes en individuos sexualmente inmaduros.

Es necesario que los gametos tras su liberación, presenten las características estructurales y fisiológicas que les permitan ser aptos para la fecundación, como el estado de maduración de los ovocitos y movilidad de los espermatozoos.

No nos debemos olvidar de la gran importancia que tienen la selección genética de los reproductores y factores tales como la tasa de consanguinidad a la hora de evitar aberraciones cromosómicas y esterilidad en los individuos. Aún cuando se han realizado numerosos estudios y revisiones sobre el tema (Wilson, 1887; Loosanoff y Davis, 1963; Gruffyd y Beaumont, 1970; Bayne, 1976, Longo, 1983; Sprung y Bayne, 1984), es necesario profundizar más, sobre todo en aquellas especies con un marcado interés comercial.

2.2.- Cultivo larvario, metamorfosis y cultivo postlarvario

Desde los estudios de Loosanoff y Davis (1963) y de Walne (1966), muchas han sido las publicaciones acerca de la biología larvaria en bivalvos, especialmente en lo que se refiere a la alimentación y crecimiento. La mayor parte de ellas fueron recopiladas por varios autores (Bayne 1983; Gabbott, 1983) y dan informaciones sobre diferentes aspectos ecofisiológicos (crecimiento, respiración, ingestión y digestión del alimento) y bioquímicos (metabolismo energético, enzimas y ácidos grasos) del desarrollo larvario en diferentes especies de bivalvos (Lucas, 1976, 1983).

Se ha constatado que las altas mortalidades se limitan principalmente a los estados perizigótico, larvario y postlarvario, por ello es importante que el control del desarrollo se ejerza principalmente sobre estos estados.

Los problemas que aparecen durante estos períodos están fundamentalmente relacionados con la nutrición. Es significativo, pues, controlar no sólo la cantidad sino también la calidad del alimento suministrado. También se debe considerar que uno de los factores que más afecta a los cultivos larvarios es la proliferación bacteriana, causa de grandes mortandades.

Tanto el control del alimento como de las condiciones del medio de cultivo van a afectar a la supervivencia y calidad de los desarrollos larvarios, lo que es importante a la hora de conseguir larvas aptas para superar la difícil etapa de la metamorfosis.

Esta tiene lugar al cabo de 13 a 20 días, según las condiciones de cultivo, cuando la larva veliger desarrolla un pie musculoso iniciando así la vida bentónica. Las almejas comienzan a reptar, pierden el velo que les ha servido para nadar y filtrar alimento y comienzan a desarrollar las branquias pasando así, al estado de postlarva.

2.3.- Preengorde y engorde

En este trabajo estas fases del cultivo no las tratamos pero es importante definir las puesto que, de la calidad de las postlarvas obtenidas va a depender el éxito en el cultivo posterior.

La fase de preengorde tiene lugar desde que la semilla sale del criadero hasta que alcanza la talla de siembra en el sustrato (13-15 mm) y en este momento, comienza su engorde que finaliza cuando llega a la talla comercial (3,8 cm).

Sin embargo, cuando las postlarvas en el criadero alcanzan una talla mínima de 1 o 2 mm, dado el consumo de fitoplancton que representan, deberían comenzar ya su preengorde en sistemas en el medio natural, donde pueden hacer uso del alimento presente en el agua. Para poder reducir esta talla mínima de inicio del preengorde en el medio natural, se están realizando estudios (Cerviño y col., 2005; García y col., 2005).

Hasta ahora experiencias realizadas por Abella y col., 2001, sobre preengorde y engorde de almeja babosa en la Ría de Arousa, han constatado que es posible alcanzar la talla de siembra tras dos meses de preengorde partiendo de semilla de 10 mm que se prolonga hasta los tres o cuatro meses, si el tamaño inicial es de 5 mm.

En este trabajo también se estima que el período de engorde requerido para alcanzar la talla comercial (3,8 cm) sea de aproximadamente 13-16 meses desde su siembra en los parques de cultivo, dependiendo de la talla media con que se inicie el proceso y de la época del año en que se desarrolle cada fase.

Para mejorar la etapa de preengorde, se están buscando otras alternativas como son, el uso del agua de efluente de piscifactorías obteniendo los primeros resultados (Guerra, comunicación personal).

2.4.- Alimentación

Durante el desarrollo larvario existe una primera fase lecitotrófica durante la cual los individuos en estado embrionario, viven a expensas de la utilización de las reservas vitelinas (período endotrófico que dura de 2-5 días) seguida por una segunda fase exotrófica durante la cual, el fitoplancton es la principal fuente de su alimentación hasta la metamorfosis. El cambio nutricional entre las dos fases se efectúa progresivamente (fase mixotrófica) y en el cual, la larva comienza a alimentarse después de agotar sus reservas vitelinas (Lucas y col., 1986).

2.4.1.- Alimento vivo: microalgas marinas

El fitoplancton son partículas orgánicas microscópicas, en general menores de 20 μm , que se encuentran suspendidas en el agua. Este tipo de partículas se puede dar en cantidades muy variables, desde menos de un millón por litro, que difícilmente pueden sostener población alguna de bivalvos, hasta 50 y 100 millones por litro, óptimas para el crecimiento de densos bancos. En las Rías Bajas, esta concentración puede variar entre 2 y 25, dependiendo del lugar, la época del año, la marea y los distintos stocks de animales filtradores que viven de este alimento. Queda decir que, no todos los tipos de partículas orgánicas de este tamaño tienen el mismo valor nutritivo.

Gracias a las células epiteliales ciliadas y mucosas que recubren la branquia de los moluscos bivalvos, un complejo mecanismo de corrientes y contracorrientes en la cavidad paleal, lleva las partículas seleccionadas, embebidas en moco, hasta los palpos labiales y la boca.

En los cultivos, cuando se utilizan regímenes alimenticios monoespecíficos, el crecimiento de larvas y juveniles de bivalvos marinos es muy variable en función de las especies microalgales empleadas (Bayne, 1965; Waldock y Nascimento, 1979; Nascimento, 1980; Enright y col., 1986a; Laing y Millican, 1986; Delaunay, 1992). En general se observa que la mezcla de varias especies microalgales (regímenes alimenticios pluriespecíficos) tienen un efecto sinérgico sobre el crecimiento de las larvas de bivalvos marinos (Epifanio, 1976) indicando esto que las deficiencias diferentes según las especies microalgales utilizadas, son compensadas.

El origen de la variabilidad en la calidad nutricional de las microalgas debe encontrarse en su composición bioquímica, siempre que cumplan los requerimientos de ingestibilidad (limitados por el tamaño y la forma), digestibilidad (en función de la capacidad de las larvas para romper sus estructuras externas y asimilar sus componentes nutricionales) y no toxicidad (sustancias nocivas para las larvas).

La composición global mayoritaria en diferentes microalgas o en microalgas idénticas pero modificadas por las condiciones de su cultivo, no ha podido relacionarse con las diferencias de crecimiento observadas en larvas de ciertas especies de bivalvos (Waldock y Nascimento, 1979; Epifanio, 1979; Chu y col., 1982; Webb y Chu, 1983; Enright y col., 1986a).

La composición en compuestos esenciales (aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y oligoelementos) y no la cantidad total de proteínas, lípidos o glúcidos puede ser la responsable de las diferencias en cuanto al valor nutricional de las microalgas.

Los datos referidos a la composición en aminoácidos y azúcares (Brown, 1991) de un extenso número de microalgas muestran pequeñas diferencias que no pueden explicar los distintos resultados observados en el crecimiento larvario.

Sin embargo, en los datos de la composición en ácidos grasos de numerosas microalgas sí que se observa una gran variabilidad interespecífica (Ackman y col., 1968; Ben-Amotz y col., 1987; Volkman y col., 1989). Se puede resaltar dentro del grupo de las clorofíceas la deficiencia en ácidos grasos de más de tres dobles enlaces. En cuanto a ácidos grasos considerados esenciales en organismos marinos, las diatomeas son una fuente de ácido eicosapentaenoico [EPA, 20:5(n-3)] (Kates y Volcani, 1966), mientras que el docosahexaenoico [DHA, 22:6(n-3)] abunda en los dinoflagelados (Harrington y col., 1970; Graeve, 1993).

También se ha observado una variabilidad intraespecífica afectada por las condiciones del cultivo referidas a la temperatura y a la intensidad luminosa (Mortensen y col., 1988; James y col., 1989; Sukenik y col., 1989) o por la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo microalgal (exponencial o estacionario) (De Pauw y Persoone, 1988; Brown y col., 1989).

Estas diferencias se relacionaron con variaciones en el crecimiento de larvas y postlarvas de bivalvos. Así Enright y col. (1986b) constatan una relación entre una alimentación limitante en DHA con una disminución en el crecimiento de juveniles de ostra. Langdon y Waldock (1981), observan el mismo fenómeno al alimentar juveniles de *Crassostrea gigas* (ostra del pacífico) con *Dunaliella tertiolecta* (clorofícea), este descenso de crecimiento se invertía con dietas suplementadas en DHA, o con extractos lipídicos ricos en EPA y DHA.

A partir de aquí, se han realizado numerosos trabajos sobre los cultivos larvarios de diferentes especies de bivalvos de interés en la acuicultura (mejillón, vieira, ostión, almeja japonesa, ostra plana, ostra americana y ostra del pacífico) haciendo especial hincapié en la evolución de los cultivos larvarios en función de la calidad del alimento microalgal y en especial del aporte de EPA y DHA, considerados esenciales para su crecimiento (Waldock y Holland, 1984; Albentosa y col., 1994, 1996b; Delaunay, 1992; Soudant, 1995).

En el cultivo de bivalvos marinos se han seleccionado, por sus óptimos resultados referidos a la facilidad de cultivo, a la densidad de cultivo, así como a la calidad nutricional en componentes bioquímicos mayoritarios (proteínas, lípidos y glúcidos) como minoritarios (ácidos grasos esenciales), las diferentes microalgas que van a tener la siguiente clasificación taxonómica (De Pauw y Persoone, 1988):

- 1.- **CLASE BACILLARIOPHYCEAE (DIATOMEAS):** *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*.
- 2.- **CLASE HAPTOPHYCEAE:** *Isochrysis galbana*
- 3.- **CLASE CHRYSOPHYCEAE:** *Monochrysis (Paulova lutheri)*
- 4.- **CLASE PRASINOPHYCEAE:** *Tetraselmis suecica*

2.4.2- Alimento artificial: microencapsulación

En consecuencia, el cultivo masivo de bivalvos marinos depende de la producción a gran escala de algas unicelulares (Coutteau y Sorgeloos, 1992), siendo un factor limitante en una hatchery comercial por la gran cantidad de biomasa microalgal que se requiere (Manzi y Castagna, 1989).

Además no solo es importante para los cultivos larvarios la disposición de las microalgas sino también su calidad nutritiva, es decir, dada su distinta composición bioquímica, dependiendo del tipo de especie empleada y de su técnica de cultivo, va a influir en la calidad del alimento aportado.

Deben, por consiguiente, aportar proteínas, soporte básico del crecimiento, así como combustibles energéticos (azúcares y grasas) y componentes esenciales (ácidos grasos esenciales), vitaminas y sales minerales.

Dentro de los lípidos, los ácidos grasos van a jugar un papel fundamental en los cultivos larvarios, al ser fuente de energía en períodos de ayuno (durante las etapas lecitotrófica y de metamorfosis), así como fuente de sillares estructurales para la construcción de sus biomembranas (constituidas por fosfolípidos y colesterol).

En estos fosfolípidos (principalmente fosfoacilgliceroles y esfingolípidos) abundan ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la serie ω 3. Dentro de estos, los altamente insaturados (HUFAs), tales como el EPA y el DHA, se consideran esenciales y por lo tanto deben de ser incorporados a las dietas de peces marinos (Ibeas y col., 1994), crustáceos (Castell, 1983) y moluscos (Chu y Greaves, 1991).

Esto ha llevado a que una gran cantidad de autores empleen la alimentación artificial como suplemento o complemento de la alimentación viva, siendo diversos los tipos de vehiculación lipídica propuestos:

- Microcápsulas con cubierta lipídica que engloben compuestos hidrofílicos (Langdon y Siegfried, 1984)
- Microcápsulas con cubierta de gelatina-acacia que rodean gotículas lipídicas (Langdon y Waldock, 1981; Rodríguez y col., 1992; Southgate y Lou, 1995)
- Microesferas lipídicas (Robinson, 1992a, 1992b)
- Liposomas (Parker y Selivonchick, 1986)
- Emulsiones lipídicas (Caers y col., 1998, 1999)

Las GAM (microcápsulas de gelatina-acacia) son las preferentemente empleadas en la administración de lípidos en estudios nutricionales con bivalvos marinos (Chu y col., 1982, 1987; Southgate, 1988; Numaguchi y Nell, 1991; Knauer y Southgate, 1997a, 1997b; Nóvoa y col., 2002), al conseguir reproducir tamaños de partículas similares a los de las microalgas (2-20 μm).

Su interés es amplio y aparte de su uso como complemento nutricional, se pueden emplear como herramientas de trabajo en estudios de asimilación incluyendo en ellas, fosfolípidos o ácidos grasos marcados para observar cuáles son los compartimientos tisulares en los que se distribuyen.

3.- IMPORTANCIA DE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS

La gran mayoría de los estudios realizados en cultivos larvarios de bivalvos marinos, se enfocaron al comportamiento del desarrollo larvario en función de la dieta microalgal o suplementada con lípidos ricos en $\omega 3$. Los estudios se centraron inicialmente en el análisis de la composición en ácidos grasos totales de las larvas, posteriormente se diferenciaron las fracciones de ácidos grasos polares y neutros y en los últimos tiempos se analizan los ácidos grasos de las familias de lípidos polares fundamentalmente y neutros. Paralelamente se comienzan a estudiar los perfiles en esteroides.

En estos estudios se intenta comprobar la esencialidad del EPA y el DHA, analizando la evolución del cultivo con su aporte.

Por todo ello y por ser fuente energética y aportar sillares estructurales en las distintas etapas de la vida larvaria, vamos a desarrollar un apartado dedicado a los lípidos incluyendo algunos conocimientos generales.

3.1.- Los lípidos

3.1.1.- Definición, clasificación y funciones

No existe ninguna definición exacta del término lípido. En su sentido más amplio, "lípido" define sustancias como los aceites, las grasas y las ceras que se pueden caracterizar por una serie de propiedades comunes como son:

- Están presentes en animales y plantas (vivos o fosilizados)
- Son insolubles o inmiscibles en agua
- Son solubles en solventes orgánicos tales como cloroformo, éter, benceno y acetona
- Contienen carbono, hidrógeno y también oxígeno, fósforo, nitrógeno y azufre

Actualmente el término se restringe frecuentemente a los ácidos grasos, sus derivados naturales (ésteres o amidas) y compuestos biosintéticamente relacionados (Christie, 1982).

Los lípidos son por excelencia moléculas biológicas multifuncionales, utilizadas tanto como elementos estructurales de membrana (fosfolípidos y esteroides), conectores que permiten la inserción en membrana de ciertas proteínas; o como metabolitos particularmente ricos en energía (cuando se trata de ácidos grasos o de triacilglicerol). También son los precursores inmediatos de un gran número de mensajeros intra y extracelulares (eicosanoides, diacilglicerol, fosfoinositoides y esteroides).

Según Christie (1982), los lípidos pueden clasificarse por su composición química y estructural en: **simples** o **neutros** y **complejos** o **polares**.

Los lípidos **simples** están constituidos por uno o dos tipos de compuestos generalmente neutros (con la excepción de los ácidos grasos libres que se incluyen en este grupo), diferenciando los siguientes:

- **Acilgliceroles:** Triacilgliceroles (también llamados triglicéridos) y sus derivados Di y Mono, contienen una molécula de glicerol a la que se unen 3, 2 o 1 ácidos grasos mediante enlaces éster. Los triglicéridos son los componentes mayoritarios de casi todas las grasas y aceites comercialmente importantes de origen animal o vegetal. Los diacilgliceroles aparte de ser productos del metabolismo de los triglicéridos, pueden tener una función en numerosos procesos celulares como segundos mensajeros formados a partir del fosfatidilinositol. Los monoacilgliceroles mayoritariamente son los productos finales de la digestión intestinal de las grasas en animales.

- **Alquildiacilgliceroles y alquenildiacilgliceroles:** Análogos a los triglicéridos pero con un enlace éter en el carbono 1 de tipo alquílico (glicerol-O-grupo alquílico) ó vinílico (glicerol-O-CH=CH-grupo alquílico), pudiendo ser los primeros una forma de reserva lipídica mayoritaria en animales marinos. A los segundos se les conoce también como plasmalógenos neutros.

- **Esteroles:** Moléculas con un sistema anular tetracíclico con un grupo hidroxilo en posición 2 que puede encontrarse esterificado dando lugar a los éster derivados. El colesterol libre se encuentra en membranas celulares regulando la fluidez de las mismas. Su forma esterificada con ácidos grasos parece tener un papel de transporte y/o almacenamiento.

- **Ésteres de ceras:** Moléculas neutras constituidas por la unión mediante un enlace éster de una cadena carbonada larga de un alcohol primario con una cadena larga de un ácido graso. Son las formas de almacenamiento lipídico mayoritarias en especies marinas de latitudes altas.

- **Tocoferoles:** Benzopiranoles metil sustituidos que aparecen en aceites vegetales. La vitamina E, o α -tocoferol es un potente antioxidante natural.

- **Ácidos grasos libres**

Los lípidos **complejos** o **polares** contienen a menudo tres o más identidades químicas, alguna de las cuales les confiere características polares. Se diferencian tres grupos principales:

- **Fosfoglicéridos:** También llamados glicerofosfolípidos o fosfoacilglicerol. Tienen una estructura similar a un acilglicerol, diferenciándose en que en posición 3 del glicerol, se une una cabeza polar mediante un grupo fosfato con un enlace fosfodiéster. La estructura básica es el ácido fosfatídico (glicerol, ácidos grasos y grupo fosfato). Las moléculas que forman la cabeza polar: colina, etanolamina, serina, inositol y glicerol, dan sus nombres a los diferentes fosfoglicéridos (p. ej. fosfatidilcolina). Son uno de los tres componentes mayoritarios de las membranas, junto con el colesterol libre y los fosfoesfingolípidos.

- **Plasmalógenos polares:** Presentan en posición 1 del glicerol un enlace éter de tipo alquílico (p. ej. plasmanil de fosfatidiletanolamina) o de tipo vinílico (p. ej. plasmenil de fosfatidiletanolamina). Se encuentran en fosfolípidos de membrana de especies animales y microbianas.

- **Glicerolípidos:** También llamados glicolípidos, son diacilglicerol que en posición 3 del glicerol se unen a una o más moléculas glucídicas (glucosa, galactosa) mediante enlace glucosídico. También son componentes de membrana, predominando en las de tejidos fotosintéticos de vegetales, siendo minoritarios en animales.

- **Esfingolípidos:** Su estructura base está formada por una cadena alifática larga aminada, conteniendo 2 o 3 grupos hidroxilo y a menudo un doble enlace "trans" en posición 4. La esfingosina es la estructura base de los esfingolípidos. El ensamblamiento de un ácido graso al grupo amino mediante un enlace amida da lugar a las ceramidas. La unión de un grupo fosfato mediante un enlace fosfoéster al grupo hidroxilo en posición 1, da lugar a los distintos fosfoesfingolípidos o fosfoceramidas, en función de la cabeza polar que se una a su vez al grupo fosfato mediante otro enlace fosfoéster (p. ej. cabeza polar colina da lugar a la esfingomielina). Si en vez del grupo fosfato, se unen una o varias moléculas glucídicas mediante enlace glucosídico al grupo hidroxilo en posición 1, obtenemos los distintos glucoesfingolípidos o glucoceramidas: cerebrósidos, monoglucosilceramidas;

diosilceramidas; oligosilceramidas; gangliósidos: oligosilceramidas con ácido siálico; sufoglicoesfingolípidos o sulfátidos, grupo sulfato unido al azúcar.

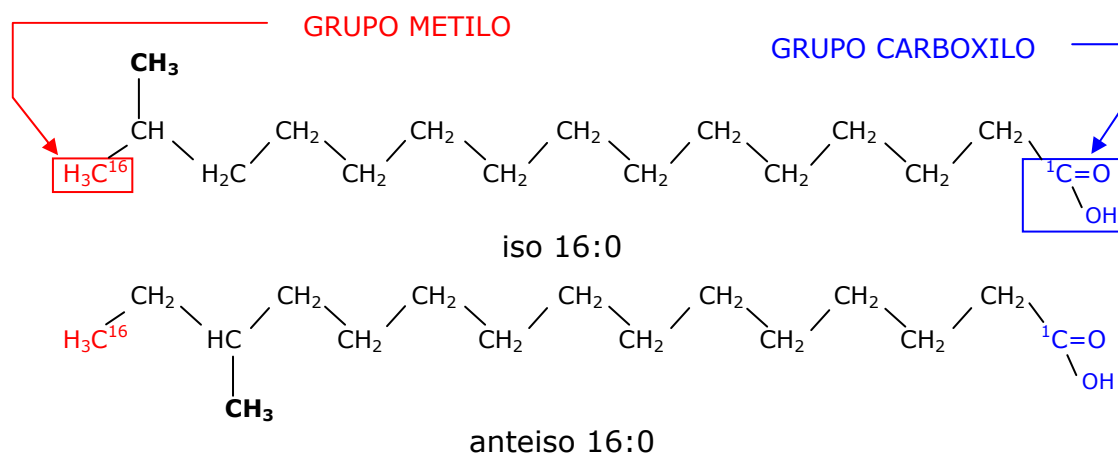
Se puede hacer otra clasificación de los lípidos de acuerdo a su función fisiológica, dividiéndolos en **lípidos de reserva** (triacilgliceroles fundamentalmente) y **lípidos estructurales** (siendo los mayoritarios los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y el colesterol libre).

3.2.- Los ácidos grasos

3.2.1.- Definición, nomenclatura y clasificación

Constituyente primario de la mayoría de los lípidos cuya estructura es una cadena alifática con un grupo funcional carboxilo. Los ácidos grasos se clasifican en función de la cadena carbonada, diferenciándose los ácidos grasos saturados, los monoinsaturados con un doble enlace y los poliinsaturados con dos o más dobles enlaces. Los dobles enlaces suelen tener configuración "cis" y encontrarse conjugados dentro de la cadena y frecuentemente separados por un grupo metileno, $-\text{CH}_2-$.

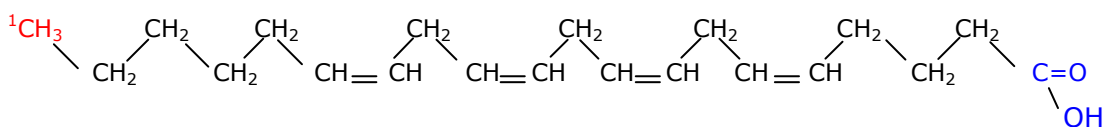
Los ácidos grasos lineales son los más abundantes tanto en el reino animal como vegetal, también podemos encontrar ácidos grasos ramificados en cantidades apreciables en animales marinos y bacterias. En bivalvos aparecen ácidos grasos con ramificaciones terminales "iso" y "anteiso", pudiendo tener la función de incrementar la fluidez de las membranas y siendo una alternativa a los dobles enlaces.



Los ácidos grasos pueden nombrarse de 4 formas:

- Nombre trivial: p. ej. ácido araquidónico (arachidonic acid)
- Nombre reconocido por la IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry): ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)
- Nombre abreviado haciendo referencia al grupo carboxilo terminal: 20:4 Δ 5,8,11,14
- Nombre abreviado haciendo referencia al grupo metilo terminal: 20:4(n-6)

En nuestro trabajo, los ácidos grasos se identifican por la fórmula C:X(n-Y), donde C hace referencia al número de átomos de carbono, X informa acerca del número de dobles enlaces e Y, indica la posición del carbono del primer doble enlace contado a partir del grupo metilo terminal. Así para el ácido araquidónico se emplea la nomenclatura 20:4(n-6).



Se distinguen tres familias:

- Ácidos grasos saturados, AGSA o SAFAs. Aquellos que no presentan dobles enlaces (p. ej. 18:0 o ácido esteárico)
- Ácidos grasos monoinsaturados, AGMI o MUFAs. Ácidos grasos con un solo enlace (p. ej. 18:1(n-9) o ácido oleico)
- Ácidos grasos poliinsaturados, AGPI o PUFAs. Aquellos con dos o más dobles enlaces (p. ej. 18:2(n-6) o ácido linoleico)

Dentro de estos últimos vamos a distinguir los HUFAs o ácidos grasos altamente insaturados, que se corresponden con aquellos ácidos de cadena larga (≥ 20 átomos de carbono) y con más de tres dobles enlaces. Son representantes de este grupo:

- Ácido araquidónico (ARA) o 20:4(n-6)
- Ácido eicosapentaenoico (EPA) o 20:5(n-3)
- Ácido docosahexaenoico (DHA) o 22:6(n-3)

También se hace referencia a los ácidos grasos esenciales (EFAs), entendiendo como tales aquellos que no pueden ser biosintetizados por los organismos, debiéndose aportar en la dieta.

Así, en el reino animal, los animales superiores carecen de enzimas que puedan introducir dobles enlaces mas allá del carbono 12 ($\Delta 12$ y $\Delta 15$ -desaturasas), siendo esenciales el ácido linoleico, 18:2 $\Delta 9,12$ o 18:2(n-6) y el ácido linolénico, 18:3 $\Delta 9,12,15$ o 18:3(n-3) (Mazliak, 1980; Pohl, 1983; Stumpf 1983).

En peces, crustáceos y moluscos se consideran también esenciales el ARA, EPA y DHA al creerse que estos organismos carecen de la maquinaria enzimática que los pueda biosintetizar (Ibeas y col., 1994; Castell, 1983; Chu y Greaves, 1991).

3.2.2.- Metabolismo de los ácidos grasos en bivalvos marinos

En general los ácidos grasos, aparte de obtenerse a partir de la dieta, pueden ser biosintetizados en el citosol de tejidos especializados como el hepático y el adiposo en animales superiores o sus equivalentes en bivalvos marinos (hepatopáncreas).

3.2.2.1.-Biosíntesis de ácidos grasos

En el citosol de estas células, el acetil-CoA proveniente de diferentes orígenes, se transforma en malonil-CoA por la acción de la acetil-CoA carboxilasa o ACC, enzima limitante y sometida a regulación hormonal y por diferentes metabolitos.

Una molécula de ácido palmítico (16:0) se forma por la condensación de una molécula de acetil-CoA y 7 de malonil-CoA, siendo

catalizado el proceso por un complejo multienzimático denominado ácido graso sintetasa o AGS (fatty acid synthetase, FAS).

Un aumento en la actividad ACC (acetil-CoA carboxilasa, transformando el acetil-CoA en malonil-CoA) y en la actividad FAS (complejo multienzimático ácido graso sintetasa), se pone en evidencia en el manto de *Mytilus edulis* durante la vitelogénesis (Kluytmans y col., 1985).

En mamíferos, el ayuno y regímenes ricos en glúcidos disminuyen y aumentan respectivamente la expresión del gen FAS (Laux y Schwiezer, 1990). Por otro lado, la expresión del gen FAS en mamíferos, puede suprimirse por dietas ricas en PUFAs (n-3) (Moon y col., 2002).

El ácido palmítico es el precursor de otros ácidos grasos por mecanismos de elongación (incorporación de un par de carbonos a partir del grupo carboxílico), que ocurren en las mitocondrias y por mecanismos de desaturación (formación de dobles enlaces por procesos de oxidación), que suceden en el retículo endoplasmático. Las enzimas implicadas en estos procesos se llaman elongasas y desaturasas.

Por lo tanto, podemos hablar de las siguientes rutas o actividades biosintéticas:

➤ **Actividad $\Delta 9$ D: series omega-7 y omega-9**

El ácido palmitoleico 16:1(n-7) y el ácido oleico 18:1(n-9) son los ácidos grasos precursores de las series $\omega 7$ y $\omega 9$, por la acción de la $\Delta 9$ -desaturasa ($\Delta 9$ D) sobre el 16:0 y 18:0, respectivamente.

La esteroil-CoA desaturasa (SCD) es la enzima responsable de dicha actividad, siendo una enzima reguladora que juega un papel importante en el metabolismo e interviene en la síntesis de los MUFAs activados: palmitoleil-CoA y oleil-CoA, a partir del palmitoil-CoA y del esteroil-CoA. Estos MUFAs son sustratos mayoritarios en la síntesis de varios tipos de lípidos que incluyen fosfolípidos, triglicéridos, ésteres de

colesterol y ésteres de ceras. Así el 18:1(n-9) es el sustrato de referencia para la acil-CoA (colesterol aciltransferasa, ACAT) y para la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), enzimas responsables de la síntesis de ésteres de colesterol y triglicéridos, respectivamente.

Para la SCD se clonaron genes de diferentes especies incluyendo levaduras (Stukey y col., 1990), el gusano *Chaenorabdytis elegans* (Watts y col., 2000), oveja (Ward y col., 1997), hámster (Ideta y col., 1998), rata (Mihara, 1990), ratones (Zheng y col., 2001; Kaestner y col., 1989; Ntambi y col., 1988) y humanos (Zhang y col., 1999; Zhang y col., 2001).

Se identificaron diferentes isoformas de la SCD, así en ratón se conocen tres: SCD1, SCD2 y SCD3 (Zheng y col., 2001; Kaestner y col., 1989; Ntambi y col., 1988). En humanos sólo se ha caracterizado e identificado una única funcional SCD gen en el cromosoma 10.

En condiciones nutricionales normales se encuentra altamente expresado el RNAm de la SCD1 en tejido adiposo blanco y marrón. El hígado sufre una sobreexpresión en respuesta a dietas ricas en carbohidratos (Ntambi, 1992). La SCD2 se expresa predominantemente en el cerebro y es inducida progresivamente durante el período de mielinización neonatal (DeWille y col., 1992a; Garbay y col., 1998; DeWille y col., 1992b). El RNAm de la SCD2 se expresa en menor medida en: riñón, bazo, corazón y pulmón, siendo inducida en respuesta a dietas ricas en carbohidratos (Zheng y col., 2001; Kaestner y col., 1989; Kim y col., 1999).

No existen datos de la actividad SCD en bivalvos marinos, pero la presencia de palmitoleato y oleato, tanto en lípidos polares como en neutros, induce a pensar en un papel activo tanto en la síntesis de lípidos de membrana como en lípidos de reserva. En consecuencia, viendo la posible regulación de la SCD por factores dietarios, como parece indicar el efecto inhibidor de los PUFAs, se puede pensar en un efecto negativo de las dietas microalgales con un exceso en el aporte de PUFAs de la serie (n-3) en el crecimiento de las larvas.

En la Figura 6 se muestra el papel de la SCD1 en la síntesis de lípidos y su regulación por factores alimentarios.

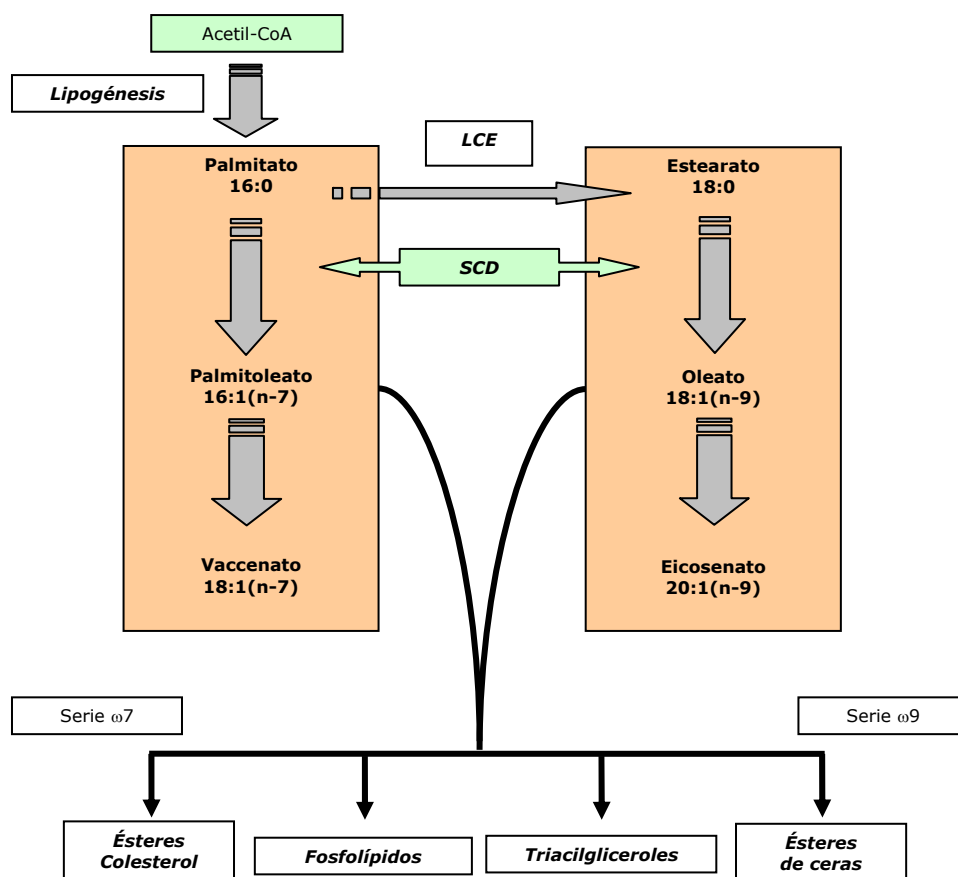
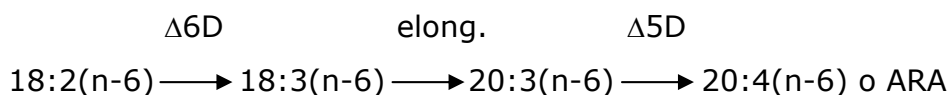


Fig. 6: Papel de la estearoil-CoA desaturasa (SCD1) en la síntesis de lípidos, regulación por factores alimentarios: aumenta con dietas ricas en carbohidratos, glucosa, fructosa, vitamina A y D y colesterol, disminuye con dietas ricas en PUFAs (n-3) y (n-6). LCE (Elongasa de Cadena Larga).

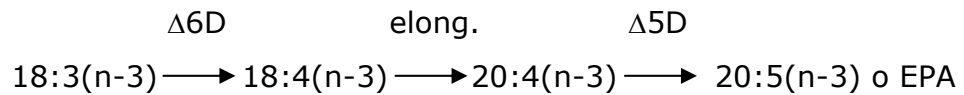
➤ **Actividad $\Delta 12D$: serie omega-6**

El sustrato es el ácido oleico dando lugar al 18:2(n-6) a su vez precursor de todos los ácidos grasos de la serie $\omega 6$, mediante la ruta metabólica $\omega 6\Delta 6$.



➤ **Actividad $\Delta 15D$: serie omega-3**

El sustrato es el ácido linoleico dando lugar al ácido linolénico 18:3(n-3) a su vez precursor de todos los ácidos grasos de la serie $\omega 3$, mediante la ruta metabólica $\omega 3\Delta 6$.



Tanto el 18:2(n-6) precursor de la serie $\omega 6$, como el 18:3(n-3), precursor de la serie $\omega 3$, no se pueden biosintetizar al carecer los animales de la maquinaria enzimática necesaria para la introducción de dobles enlaces mas allá del carbono 9, contado a partir de su extremo carboxílico (actividades enzimáticas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas). Estas actividades sólo las presentan los vegetales (Mazliak, 1980; Pohl, 1983; Stumpf, 1983) y por ello a estos ácidos grasos en animales se les denominan EFAs (ácidos grasos esenciales).

Ambos son los precursores de los PUFAs y HUFAs de las series $\omega 6$ y $\omega 3$, siendo su aporte imprescindible para los procesos lipogénicos en los que se requiera la biosíntesis de ácidos grasos de ambas series.

Estas rutas junto con la ruta metabólica $\omega 9\Delta^6$ implican a la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ que, con la elongasa (elong.), dan lugar a los HUFAs, mayoritarios en las dos series (EPA y DHA en la $\omega 3$, ARA y 22:5(n-6) en la $\omega 6$).

En la Figura 7 se muestran de forma esquemática el funcionamiento de estas rutas metabólicas, junto con la vía de Sprecher que se comentará posteriormente.

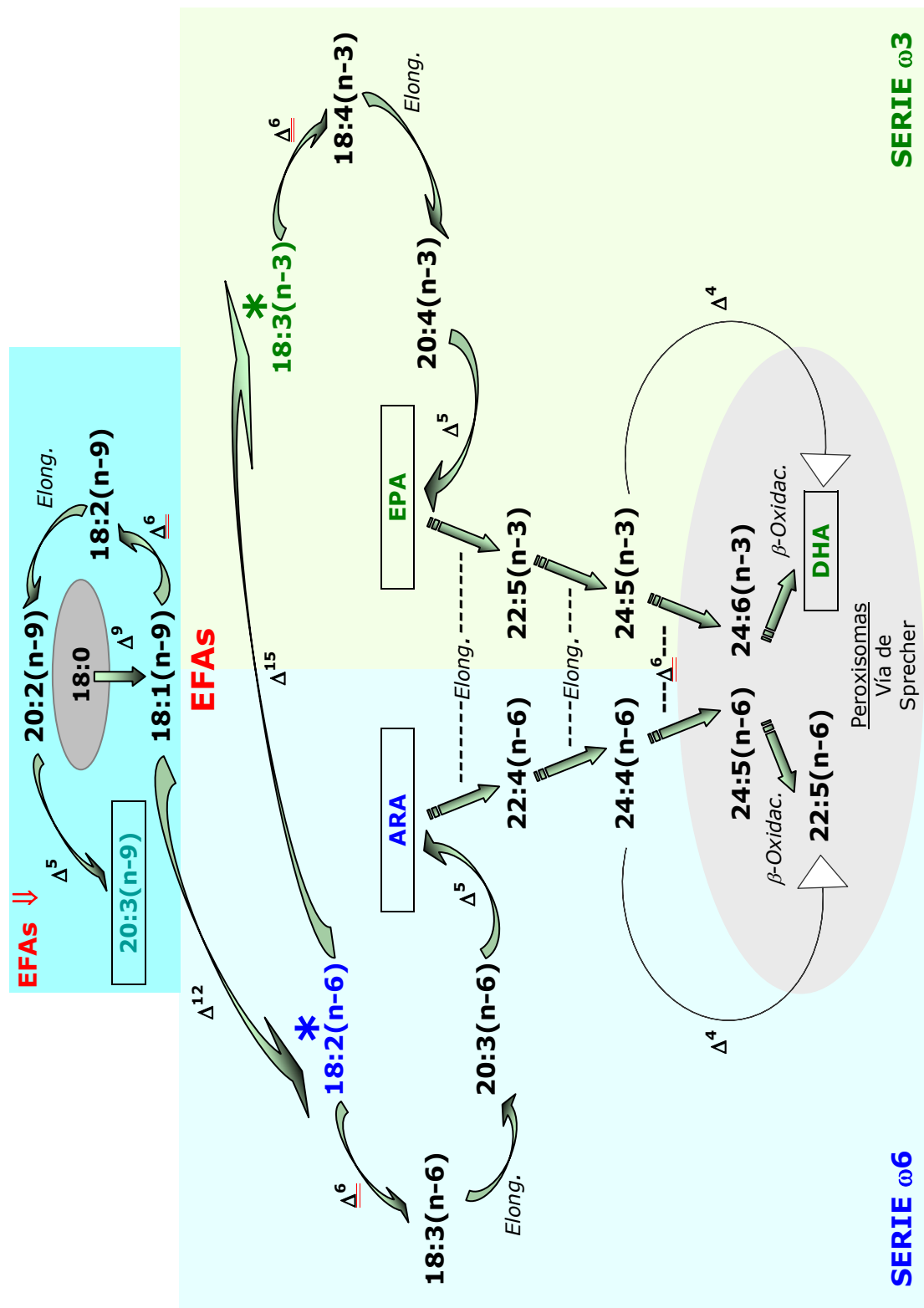


Fig. 7: Representación de las reacciones de elongación y desaturación que tienen lugar en las mitocondrias y peroxisomas para la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga a partir del 18:0. El 18:2(n-6) y el 18:3(n-3) son EFAs (*).

Las desaturasas tienen una especificidad decreciente por los metabolitos de la ruta en el sentido $(n-3) > (n-6) > (n-9)$ (Stubbs y Smith, 1984; Tocher y Dick, 1990).

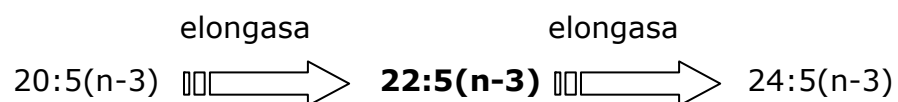
De ahí que el metabolito 20:3(n-9) aumente en humanos cuando el organismo presente una limitación en el aporte de los ácidos grasos esenciales (linolénico y/o linoleico), al activarse la ruta metabólica $\omega 9\Delta^6$.

La transformación de EPA en DHA en la serie omega-3 y su equivalente en la serie omega-6, ARA en 22:5(n-6), está sujeta a discusión.

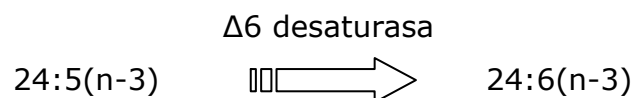
Unos autores proponen otro ciclo de elongación-desaturación, implicando a la $\Delta 4D$ y que representaría la vía de las desaturaciones-elongaciones alternativas que requieren actividades $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ -desaturasas propuestas por Brenner (1971).

Otros autores se inclinan por la vía Sprecher, propuesta por Voss y col. (1991) y que conllevaría la biotransformación de EPA en DHA, emplean las siguientes etapas:

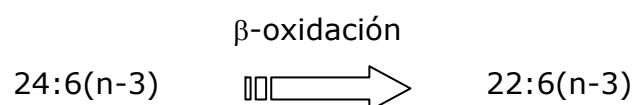
1.-Mitocondria



2.-Retículo endoplasmático



3.-Peroxisoma



La β -oxidación peroxisomal observada en hepatocitos de rata, tiene lugar por la acción de tres enzimas que presentan, a su vez, formas iso-enzimáticas (acil CoA oxidasa, una proteína bifuncional y la 3-cetoacil-CoA tiolasa), (Reddy y Hashimoto, 2001).

La bibliografía indica que la mayoría de especies de animales marinos, son incapaces o muy poco capaces de bioconvertir el ácido linoleico y linolénico procedentes de la alimentación, tanto si se trata de peces (Owen y col., 1975; Tocher y col., 1998), como de crustáceos (Kanazawa y col., 1979a) o de moluscos (De Moreno y col., 1976; Waldock y Holland, 1984).

Esta esencialidad, se entiende en términos de la escasa o nula capacidad de bioconversión de sus posibles precursores mediante la maquinaria enzimática propia del organismo marino. Hay datos de actividad $\Delta 6D$ en el bivalvo marino *Mesodesma mactroides* (De Moreno y col., 1976). Por otro lado, sólo existen referencias de actividad $\Delta 5D$ en la formación de ácidos grasos con dobles enlaces no metilen interrumpidos (NMI) (Zhukova, 1986; Zhukova, 1991), en las familias de Mytilidos y Ostreidos, apareciendo en trazas en Pectínidos (Waldock y Nascimento, 1979; Joseph, 1982; Whyte, 1988; Zhukova, 1986; Zhukova, 1991 y Marty y col., 1992). Con respecto a la supuesta actividad $\Delta 4D$, no se ha observado en mamíferos ni en bivalvos marinos, aunque sí ha sido identificada en *Thraustochytrium sp.*, un microheterótrofo marino taxonómicamente ubicado dentro de las microalgas (Qiu y col., 2001).

La consecuencia es que PUFAs de 20-22 átomos de carbono y con más de tres dobles enlaces, son verdaderos EFAs para la supervivencia, crecimiento y reproducción de estos bivalvos marinos (Cowey y col., 1976; Kanazawa y col., 1979b; Trider y Castell, 1980; Langdon y Waldock, 1981; Uki y col., 1986), gastándolos de sus reservas neutras para emplearlos como sillares estructurales en la formación de sus membranas biológicas.

➤ **Actividad ω 3 desaturasa**

Por último, la actividad ω 3 desaturasa permite transformar ácidos grasos de la serie omega-6 en ácidos grasos de la serie omega-3, introduciendo un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono, contados a partir del extremo metilo terminal. Esta actividad es inexistente en vertebrados, aunque se encuentra en un rango amplio de organismos (cianobacterias, plantas superiores y nematodos) (Nakamura y Nara, 2004).

No existen datos en bivalvos marinos que indiquen la posibilidad de biotransformación entre las series de ácidos ω 9, ω 6 y ω 3 y por lo tanto de la existencia de una actividad ω 3 desaturasa.

3.2.2.2.- β -oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos atraviesan la membrana mitocondrial interna empleando a la carnitina como transportador específico, requiriéndose la carnitina aciltransferasa I y II, y de esta manera se regula la entrada en la mitocondria de los acil-CoA, combustibles de la β -oxidación.

La β -oxidación consiste en una hidrólisis secuencial de dos unidades carbonadas, mediante tres etapas: oxidación-hidratación-oxidación y posterior ruptura tiolítica interviniendo el CoA y produciéndose, por ciclo de β -oxidación, una molécula de acetil-CoA. Para el caso de ácidos grasos insaturados se requieren una isomerasa y una epimerasa suplementarias.

Los procesos de β -oxidación están estrictamente regulados por las necesidades energéticas, aunque también se observa una reactividad de la carnitina aciltransferasa para los ácidos grasos de cadena larga decreciendo en el sentido: $18:3(n-3) > 18:2(n-6) > 20:5(n-3) = 16:0 > 20:4(n-3) > 18:1(n-9) > 22:6(n-3)$ (Gavino y Gavino, 1991).

Así en mamíferos se ha observado que el EPA se β -oxida con más rapidez que el DHA (Hertzberg y col., 1992; Hodge y col., 1993). En moluscos, concretamente en larvas de *Pecten maximus* y en sus reservas

neutras, la velocidad de desaparición del 18:4(n-3) y el EPA es superior a la del DHA (Delaunay, 1992).

Efectos similares se observaron en el desarrollo larvario de *Crassostoma gigantea*, con un alto catabolismo del EPA, mientras que los niveles de DHA se mantenían constantes (Whyte y col., 1990b).

Estos datos sugieren que ciertos AGPI, como el EPA, podrían tener un papel energético más importante que otros en ciertas condiciones, tales como en estados de ayuno o de alta demanda energética, como ocurre durante el desarrollo larvario de bivalvos (Soudant, 1995).

Los datos aportados por Valenzuela (2004), indican que durante la ovogénesis en *Crassostrea gigas*, se incrementa fuertemente en lípidos polares el contenido en fosfatidilcolina, siendo el 20:5(n-3) el ácido graso que en mayor grado se incorpora a su estructura.

Así los organismos utilizarán este combustible secundario, en casos de fuerte demanda de energía para satisfacer los procesos de biosíntesis de membranas y por lo tanto de crecimiento (característicos de etapas en las que existe una limitación en las reservas energéticas como ocurre en el período lecitotrófico).

El uso de 20:5(n-3) como combustible secundario será más evidente en aquellos organismos que almacenen menos reservas energéticas en sus lípidos de reserva (combustible primario).

También se observará, en mayor grado, durante períodos de ayuno, cuando no existe aporte externo de nutrientes que proporcionen la energía suficiente para el mantenimiento de las necesidades fisiológicas mínimas del organismo.

Por último cabe resaltar una β -oxidación peroxisomal en hepatocitos de rata (Voss y col., 1991), implicando a ácidos grasos de 24 carbonos y altamente poliinsaturados acortando su cadena en dos átomos. Los datos

referidos a la vía de Sprecher anteriormente comentada, parecen sugerir que esta β -oxidación peroxisomal está implicada más bien en procesos biosintéticos (síntesis del DHA a partir de EPA), que en procesos de obtención de energía (β -oxidación mitocondrial).

4.- PLAN DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN

4.1.- Plan de trabajo

A la vista de lo anteriormente expuesto se planteó el seguimiento de cuatro desarrollos larvarios que por los resultados obtenidos, representarán dos desarrollos buenos y dos desarrollos malos.

Se analizan en dichos cultivos los ácidos grasos correspondientes a los lípidos polares al reflejar éstos la composición de los fosfoacilgliceroles, componentes mayoritarios de los lípidos de membrana y por lo tanto, indicadores de un activo metabolismo lipogénico, habitual en la formación de biomembranas durante los procesos de crecimiento y diferenciación celular, característicos en los desarrollos embrionario y larvario.

También se analizan los ácidos grasos correspondientes a los lípidos neutros al reflejar la composición de los triacilgliceroles, constituyentes mayoritarios de los lípidos de reserva y por lo tanto ser indicadores del estado nutricional del organismo, así como de la alimentación dada.

Estos estudios se realizan en diferentes fases de los cultivos larvarios para poder observar la calidad ovocitaria y las demandas nutricionales (déficit o excesos en las dietas microalgales aportadas durante el desarrollo larvario y postlarvario).

Las fases objeto de este estudio se diferenciaron en función de los estadios de vida larvaria. Según sus dependencias nutricionales dichos estadios se van a corresponder con la siguiente clasificación:

- **1.- Estadío lecitotrófico:**

Corresponde al paso de ovocito recién fecundado hasta la obtención de la larva D.

Tanto las demandas de energía para los procesos biosintéticos, como las demandas de sillares estructurales para la construcción de biomoléculas, son satisfechas por las reservas vitelinas almacenadas en el huevo que a su vez dependen, de las reservas acumuladas por sus progenitores.

Aunque la mayoría de los bivalvos marinos pasan por diferentes estados de diferenciación celular llegando a ser morfológicamente muy diferentes en su estado adulto, presentan dos etapas muy similares: el desarrollo embrionario y la formación de la larva D. Esto lleva a que sea muy difícil de diferenciar una larva D en las distintas especies de bivalvos como es el caso de la vieira o de la almeja.

Esto hace presuponer estructuras membranosas muy parecidas entre especies muy separadas filogenéticamente. Por ello se analizan con mayor rigor los resultados obtenidos en la fracción de lípidos polares, serán similares en especies muy diferentes. Así nuestros datos en cultivos buenos y malos de almeja babosa se comparan con los aportados por otros autores sobre la vieira.

" FASE A ESTUDIAR: DE OVOCITO FECUNDADO A LARVA D "

- **2.- Estadío mixotrófico:**

En bivalvos marinos, están descritas etapas de vida mixotrófica entre larvas D y larvas de hasta cinco días en *Pecten maximus* (Soudant, 1995) así como en larvas de *Mytilus edulis* (Lucas y col., 1986).

Etapas de la vida donde conviven simultáneamente la alimentación endógena proveniente de las reservas (vitelinas en el huevo y lipídicas en las larvas veliger), con la alimentación exógena procedente del medio marino (fitoplancton).

En el caso de la almeja babosa, podríamos encontrar un estadio mixotrófico entre la formación del velo en la larva D y la funcionalidad del mismo como órgano natatorio-alimenticio (veliger temprana). Haremos una comparativa con los resultados obtenidos por otros autores en vieira, en la que sí se observó esta etapa.

" FASE A ESTUDIAR: DE LARVA D A VELIGER TEMPRANA "

- **3.- Estadío planctotrófico:**

Comprende desde la etapa de vida veliger anterior a la metamorfosis (larva pediveliger) hasta la etapa posterior a la metamorfosis (post-larva).

La alimentación es exógena aportando el alimento el medio marino.

Por todo ello, las reservas almacenadas en el ovocito, así como los nutrientes asimilados en la etapa de vida larvaria, van a ser responsables del correcto desarrollo larvario y postlarvario de la almeja babosa.

**“ FASES A ESTUDIAR: DE VELIGER TARDÍA A PEDIVELIGER
DE PEDIVELIGER A POSTLARVA ”**

4.2.- Justificación

A continuación y como justificación al plan de trabajo expuesto, vamos a desarrollar dos apartados que nos pongan en antecedentes sobre las necesidades a cubrir en estos estadios, diferenciando de dónde se obtienen los combustibles y sillares estructurales para los procesos biosintéticos durante las etapas lecitotróficas y planctotróficas.

4.2.1.- Los ácidos grasos como combustibles y sillares estructurales en el estadio de vida larvaria lecitotrófica

Según la bibliografía, el vitelo de los huevos está compuesto de lípidos, proteínas y carbohidratos, los cuales representan las fuentes de energía para el desarrollo embrionario (Heras y Pollero, 2002).

Por ello es plausible pensar que las necesidades de crecimiento y formación de biomembranas serán resueltas a partir del funcionamiento de rutas lipogénicas que sean viables en estos estadios tempranos.

Las reservas vitelinas aportan:

- Combustibles para estos procesos lipogénicos
- Sillares estructurales esenciales en la construcción de sus biomembranas y que no puedan ser formados “*de novo*” por el organismo

Los lípidos se encuentran mayoritariamente en forma de gotículas o sacos de aceite ricos en triacilgliceroles (fracción principal de los lípidos neutros), constituyendo una parte importante de las reservas del huevo de la ostra americana, *Crassostrea virginica* (Lee y Heffernan, 1991) o de vieira, *Pecten maximus* (Dorange y Le Pennec, 1989).

Estos acúmulos lipídicos son semejantes a los que presentan los adipocitos o células del tejido adiposo de animales superiores, pudiendo tener una función similar, almacenar reservas grasas para emplearlas como combustible en los procesos biosintéticos y/o almacenar sillares estructurales para su posterior utilización en procesos lipogénicos.

En sintonía con esto, está lo aportado por Sargent y Henderson (1986), los cuales indican que los sacos de aceite en copépodos son similares a adipocitos o células grasas. Blades-Eckelbarger (1986), por su parte, hace mención a que las células que rodean los sacos de aceite en el copépodo *Euchaeta marina*, se asemejan a las células del tejido adiposo blanco de los mamíferos. Por último, Zhou y col. (1996) afirman que, estos sacos de aceite son similares a los adipocitos en tejidos de peces.

Estudios realizados en animales muestran, que los ácidos grasos esenciales (EFAs): el ácido linoleico 18:2(n-6) y el ácido linolénico 18:3(n-3), procedentes de la dieta, son rápidamente almacenados en triacilgliceroles del tejido adiposo, actuando éste como un reservorio de EFAs para los procesos lipogénicos (Lin y col., 1993; Matthews y col., 2000).

Además, la composición en ácidos grasos del tejido adiposo en humanos, es un reflejo de la composición en ácidos grasos presente en la dieta (Garland y col., 1998).

Sin embargo y contrariamente a los MUFAs y a los EFAs (precursores de los PUFAs), los HUFAs, son un pobre sustrato para la síntesis de triacilglicerol y principalmente son incorporados a los fosfolípidos contribuyendo a la fluidez de las membranas (Zhou y Nilson, 2001).

Suponiendo que las reservas vitelinas ovocitarias en bivalvos marinos tienen un papel de almacén como lo tiene el tejido adiposo en humanos, los triacilglicerol acumulados (fracción mayoritaria de los lípidos neutros) reflejarán la composición en ácidos grasos de la dieta aportada a los progenitores, siendo los EFAs los que más rápidamente se almacenarán.

Por otra parte, según indicamos anteriormente, la mayoría de especies de animales marinos son incapaces o muy poco capaces de bioconvertir el 18:2(n-6) y el 18:3(n-3), procedentes de la alimentación, por lo tanto, HUFAs del tipo del ácido araquidónico (20:4(n-6)), del ácido eicosapentaenoico (20:5(n-3)) o el ácido docosahexaenoico 22:6(n-3) son verdaderos EFAs para su supervivencia, crecimiento y reproducción.

Las proteínas mayoritarias de la yema de huevo son las vitelinas, lipovitelinas o lipoproteínas del huevo (actuales HDL), que también fueron aisladas en el bivalvo marino *Pecten maximus* y en el cefalópodo, *Sepia officinalis* (Lee, 1991).

Las lipoproteínas del huevo, debido a su composición y contenido lipídico, representan del 30 al 50 % de los lípidos totales de huevos de crustáceos, poliquetos y moluscos (Lee y col., 2006). Podrían jugar un papel importante durante el desarrollo embrionario, proporcionando componentes estructurales y precursores metabólicos al no estar consideradas únicamente como fuentes energéticas para el desarrollo embrionario.

De las lipovitelinas la fosfatidilcolina es el componente mayoritario, siendo menor su contenido en colesterol y triacilglicerol (Lee, 1991). El EPA, es el ácido graso que se encuentra en mayor abundancia en el carbono 1 de la fosfatidilcolina (Kattner, 1991), debido a la mayor presencia de

PUFAs que de SAFAs en los fosfolípidos zooplanctónicos (Albers y col., 1996).

Por lo tanto, un descenso en el contenido del EPA en lípidos polares, podría reflejar el uso del mismo como combustible secundario en períodos de déficit o ayuno, tal como indican diferentes autores sobre distintas especies, al estar los fosfoglicéridos de las HDL encuadrados dentro de los lípidos polares.

4.2.2- Los ácidos grasos como combustibles y sillares estructurales en el estadio de vida larvaria planctotrófica

Las larvas de bivalvos marinos, al ser organismos planctotróficos, dependen de los nutrientes aportados por el medio marino, los cuales van a ser empleados para desarrollarse como tal y para almacenar reservas que les permitan superar la fase de metamorfosis.

Entre las etapas lecitotrófica y planctotrófica, se observa un período mixotrófico en el cual el organismo se adapta a la vida larvaria empleando alternativamente las reservas vitelinas y el alimento aportado del medio marino.

Se intentará demostrar que el éxito de los desarrollos larvarios, aparte de otros parámetros no estudiados (genéticos, medioambientales y patológicos) va a estar íntimamente ligado a dos parámetros fundamentales:

- La calidad del huevo
- La calidad y cantidad del alimento

II.-OBJETIVOS

II.-OBJETIVOS

1. Analizar cultivos larvarios de almeja babosa, *Venerupis pullastra* realizados en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA) a partir de desoves de progenitores procedentes del medio natural
2. Profundizar en la importancia de la calidad de los ovocitos obtenidos y en las necesidades nutricionales de los cultivos, haciendo un estudio de la evolución de los ácidos grasos en lípidos polares (estructurales) y lípidos neutros (de reserva) en cultivos con buenos y malos resultados
3. Comparar los resultados obtenidos en esta especie en etapas clave de su desarrollo larvario con los aportados por otros autores en otra especie de interés en acuicultura, como es la vieira
4. Investigar la posible utilización de microcápsulas de gelatina-acacia como suplemento nutricional al alimento vivo, durante los desarrollos larvarios en bivalvos marinos

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

1.-CULTIVOS

1.1.- Cultivo larvario y postlarvario

En la Figura 8 se presenta un esquema del protocolo del cultivo de *Venerupis pullastra* en el criadero del Centro de Cultivos de Ribadeo (CIMA).

1.- CULTIVO LARVARIO

Los reproductores de los distintos desarrollos larvarios, se recogen del medio natural (Camariñas) en diferentes épocas durante los años: 2000, 2001, 2002 y 2003.

En el laboratorio se mantienen en tanques de 100 litros de capacidad, con agua de mar a temperatura ambiente y en circuito abierto. A la salida de cada uno se colocan unos tamices de luz de malla inferior a 45 µm para recoger los huevos en caso de puesta.

El mismo día o al día siguiente de su llegada, si no se produce la puesta espontánea, se induce mediante shocks térmicos. Para ello las almejas se estimulan con cambios térmicos empleando agua de mar filtrada por ultravioleta y calentada con un termostato hasta la temperatura de 27 °C y enfriada posteriormente a 14 °C. Los cambios de agua a diferentes temperaturas se hacen bruscamente, también se les añaden microalgas en abundancia y gametos masculinos. Los huevos fertilizados se recogen en tamices de malla de 45 µm de luz y se trasladan a los tanques de cultivo.

El desarrollo embrionario y larvario se realiza en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 500 litros, con agua filtrada y esterilizada por UV, provistos de aireación y a una temperatura de 18 °C, así se mantienen hasta que alcanzan la metamorfosis (13-22 días).

Las densidades de los cultivos en la primera fase hasta larva D, se establecen en función de la cantidad de ovocitos fecundados obtenidos en las puestas. A partir de este momento, se trabaja con una densidad de 5-6 individuos/mL como óptima, aunque esta cantidad varía según las tasas de mortalidad.

El cambio de agua se realiza tres veces por semana, coincidiendo con la recogida de muestras y determinación de parámetros biométricos (tamaño de la concha, mortalidad, densidad larvaria, etc.).

Cuando más del 50 % de la población larvaria presenta pie (13-22 días) se trasladan a cilindros con un fondo de malla en torno a 150 μ m de luz permaneciendo en estos tanques en circuito cerrado, hasta completar la metamorfosis y pasar al estado de postlarva.

La alimentación en general, se hace diariamente con una mezcla de: *Isochrysis galbana* (Ig), *Monochrysis lutheri* (Mn), *Skeletonema costatum* (Sk), *Chaetoceros calcitrans* o *gracilis* (Chtc o Chtg) y *Tetraselmis suecica* (Ts).

Las dosis aplicadas, es decir, el **número de equivalentes** (número de células de microalgas por volumen de cultivo expresado en μ L), variaron a lo largo de los diferentes desarrollos en función del crecimiento larvario y por lo tanto, de la demanda del cultivo. Ya que el tamaño de las células de *Tetraselmis* es mucho mayor que el del resto de las microalgas utilizadas, los cálculos se hacen teniendo en cuenta que, una célula de esta especie equivale a diez *Isochrysis*.

Para los cultivos objeto de estudio, la mezcla de especies microalgales son distintas, por lo que podemos hablar de dos dietas (Tabla V).

Tabla V: Especies incorporadas a las dietas aplicadas en las distintas puestas a lo largo de los diferentes cultivos.

	Hv	Lv D	7 Días	15 Días	22 Días
D1: 2000 y 2001		Mn, Ig		Mn, Ig, Cht, Sk	
D2: 2002 y 2003		Mn, Ig, Cht, Ts			

-Dieta 1 (D1): Puestas de 2000 y 2001. Consiste en una dieta basal con *Ig* y *Mn*, a la que se incorporan otras dos microalgas (*Cht* y *Sk*) a lo largo del cultivo

-Dieta 2 (D2): Puestas de 2002 y 2003. Consiste en una mezcla microalgal fija durante todo el cultivo compuesta por: *Ig*, *Mn*, *Chtc* o *Chtg* y *Ts*

2.- CULTIVO POSTLARVARIO

Finalizada la metamorfosis las postlarvas convertidas ya en semilla se trasladan a cilindros con luz de malla adecuada a su tamaño y estos a tanques en circuito abierto adicionando una alimentación de mezcla de microalgas (cultivadas en bolsas) por goteo.

En estas condiciones permanecen creciendo hasta alcanzar el tamaño mínimo requerido para el inicio de su preengorde en el exterior.

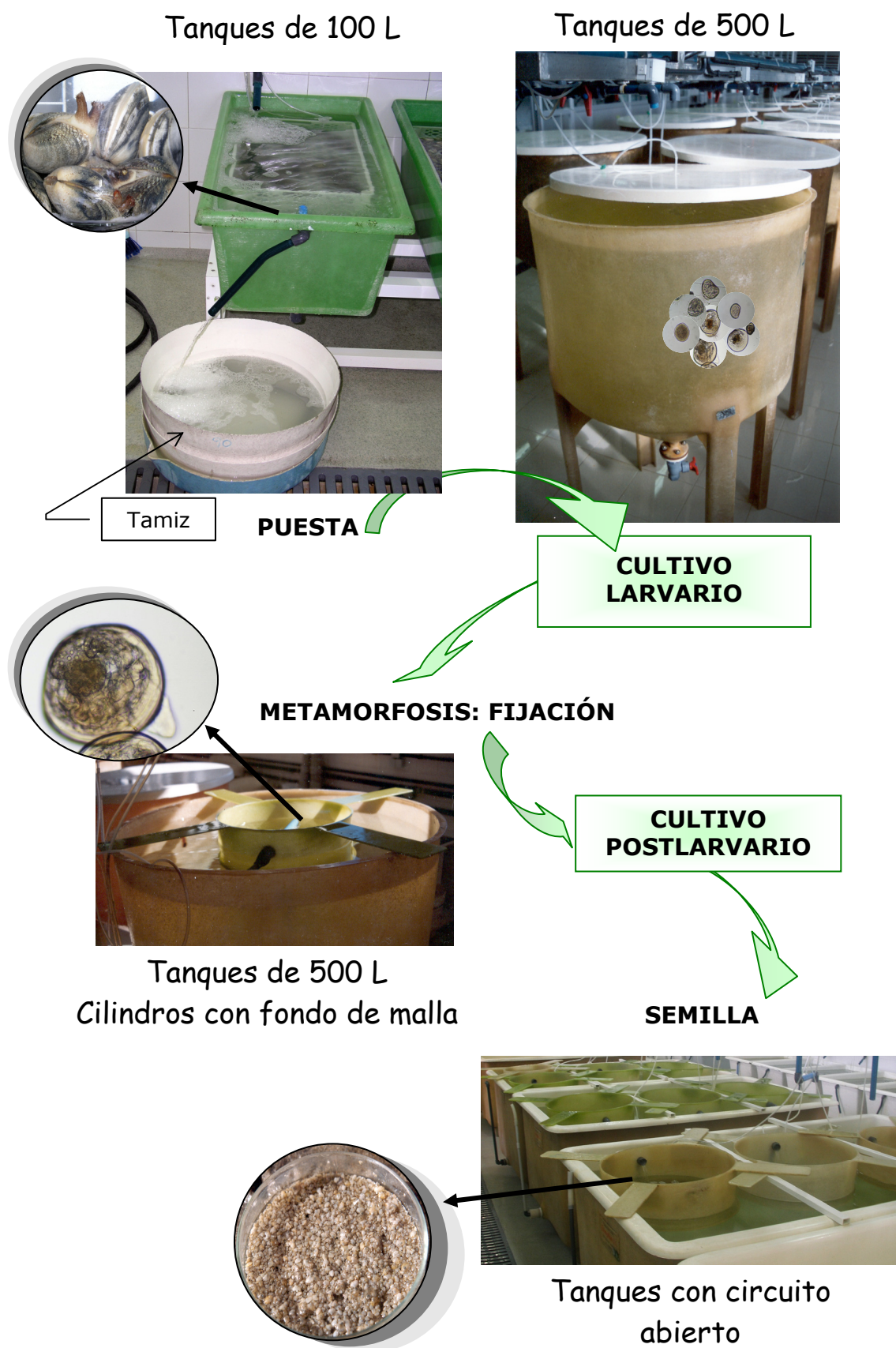


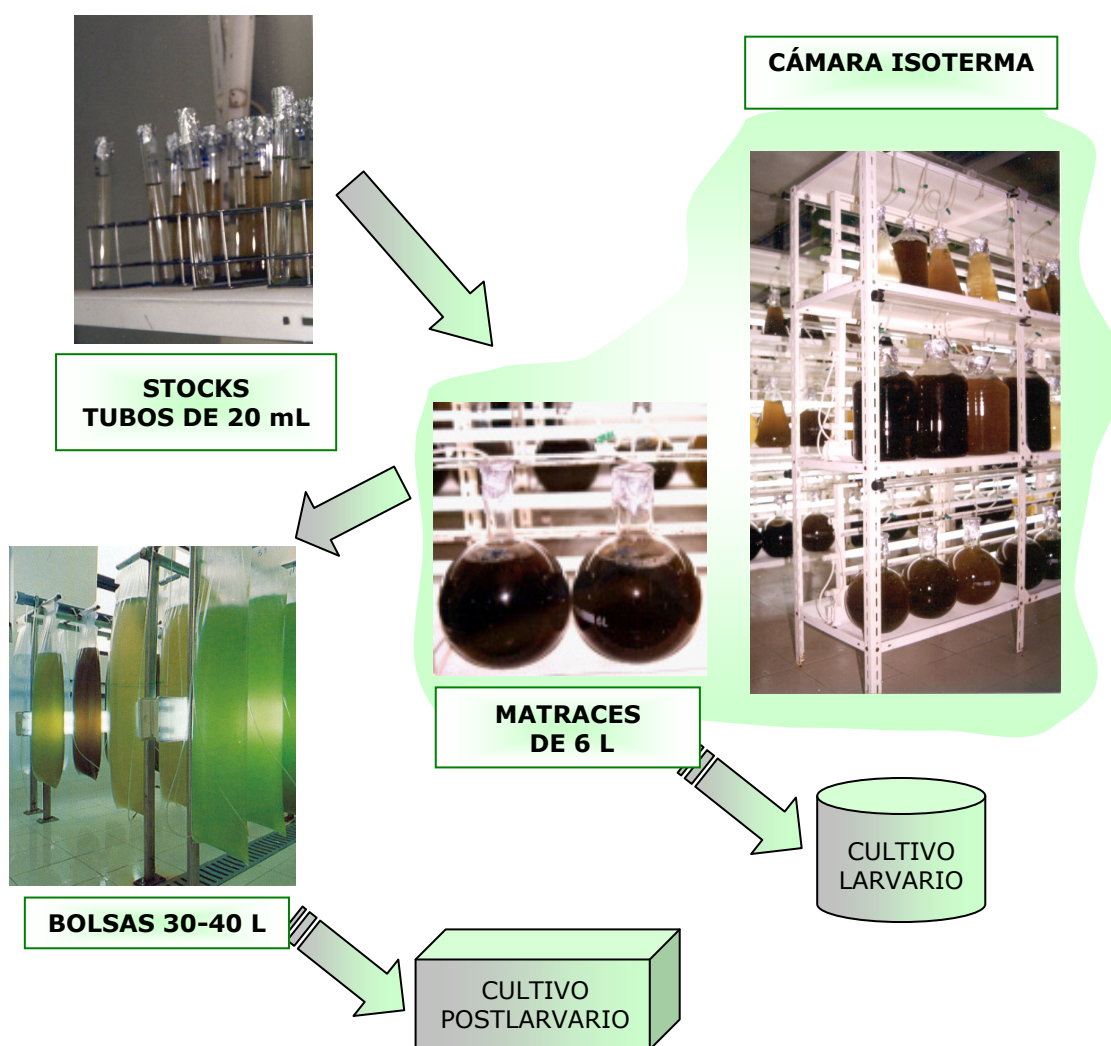
Fig. 8: Representación de un cultivo larvario y postlarvario de almeja babosa hasta la obtención de semilla.

1.2.- Cultivo de microalgas

Los cultivos de las especies utilizadas son monoespecíficos, se realizan en matraces y bolsas con agua de mar (± 32 ‰) filtrada a 1 μm .

En el caso de los matraces, el agua se esteriliza en autoclave, se enriquece con una solución de sales nutritivas (ALGAL-1: macroelementos, microelementos y vitaminas) y con un aporte suplementario de silicatos en el caso de las diatomeas. Se mantienen en una cámara isoterma con luz artificial constante y burbujeo con CO_2 .

Para las bolsas (30-40 L) la solución de sales nutritivas empleada es la solución C (fosfato, nitrato y trazas de metales en forma de sulfatos) y en este caso, el burbujeo no lleva incorporado CO_2 .



2.- EMPLEO DE MICROCÁPSULAS

2.1.- Fabricación de las microcápsulas

Las microcápsulas se fabrican según el método de Langdon y Wal-dock (1981) con las modificaciones descritas por Rodríguez y col. (1992). En general, la fabricación de estas partículas consta de tres etapas bien diferenciadas: emulsión del aceite, coacervación y endurecimiento de la cubierta (Figura 9).

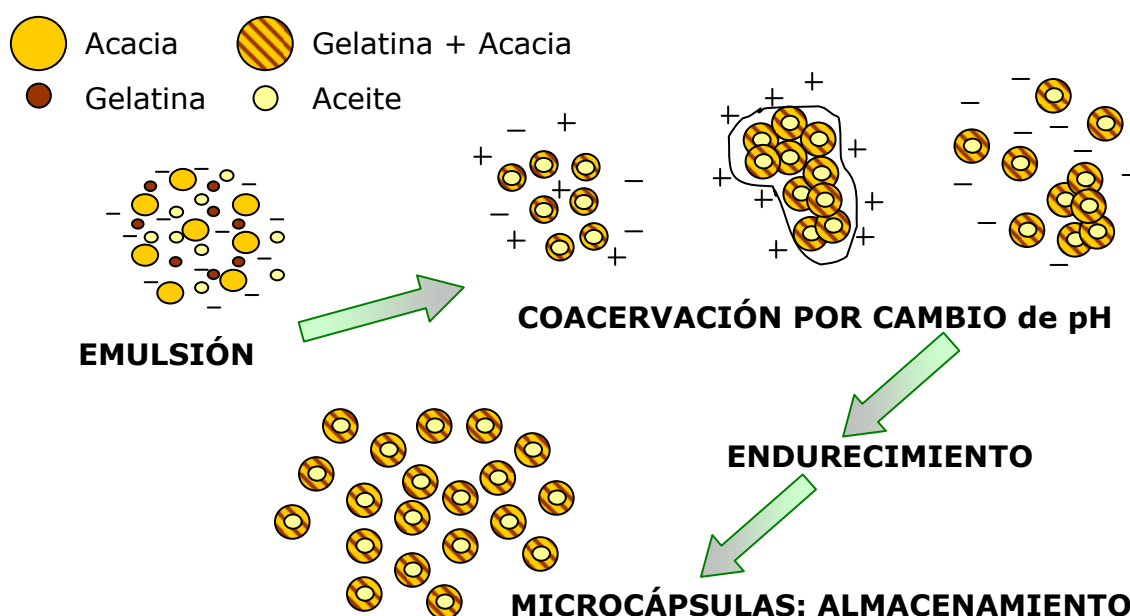


Fig. 9: Representación de las distintas fases del proceso de fabricación de las microcápsulas de gelatina-acacia con distintos aceites.

1.- EMULSIÓN

A la fase lipídica inicialmente se le añade BHT 1 ‰ para prevenir posibles oxidaciones durante la fabricación. Se utiliza una proteína (gelatina) y un polímero (goma arábica o acacia) preparados al 2 % (w/v) en agua destilada. La mezcla de ambas fases, se somete durante 1 minuto a una vigorosa agitación con un homogenizador de cuchillas Virtis, modelo TEMPEST IQ SQUARED ajustado a 40.000 rpm, para conseguir la emulsión,

manteniéndose el sistema a 40 °C, con borboteo de nitrógeno para evitar oxidaciones.

2.- COACERVACIÓN

La emulsión se conserva en las condiciones anteriores y con una agitación constante y suave. Se añade gota a gota una solución de HCl 0,01N para bajar el pH del medio hasta observar el fenómeno de coacervación de la gelatina y la acacia (precipitación y formación de la cubierta glicoproteínica que envuelve las gotículas lipídicas).

El pH óptimo dependerá del tipo de aceite a encapsular oscilando entre 4,5 y 3,9. La observación microscópica de alícuotas del coacervado a diferentes pH permitirá definir el pH óptimo de encapsulación, evitándose así la formación de agregados.

Se mantiene en estas condiciones durante 40 minutos y a continuación se eleva el pH de la solución hasta 9,3 con la adición de NaOH 0,1N, también gota a gota.

3.- ENDURECIMIENTO DE LA CUBIERTA

La solución con las microcápsulas obtenidas se lleva a dos litros de agua destilada a 5 °C y mantenida a dicha temperatura durante 2 h, favoreciéndose así el endurecimiento de la cubierta. El producto resultante, es recogido por filtración o centrifugación. Mediante centrifugación se separan microcápsulas con distinto tamaño, las mayores entre 3-4 μm y las menores entre 2,5-3,0 μm .

Siguiendo este método se fabrican dos tipos de microcápsulas de gelatina-acacia (GAMs) para la realización de experiencias:

- 1.- Para estudios nutricionales con distintos aceites
- 2.- Para estudios metabólicos con un ácido graso marcado que pueda ser rastreado

2.2.- Ensayos con las microcápsulas

2.2.1.- *In Vitro*

1.- PARA CONFIRMAR DATOS SOBRE FABRICACIÓN Y ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LAS MICROCÁPSULAS

La primera cuestión que se plantea a la hora de utilizar las microcápsulas en los cultivos larvarios, es la posibilidad de estandarizar el método de su fabricación que nos permita obtener micropartículas con los tamaños adecuados y con las menores pérdidas posibles de los aceites y ácidos grasos que incorporen.

Por otra parte, también resulta interesante determinar la mejor forma de su almacenamiento y, cuánto tiempo son capaces de permanecer en stock sin sufrir alteraciones que modifiquen su composición inicial o, la aparición de proliferaciones bacterianas que supongan un peligro en los cultivos en las que son utilizadas.

Siguiendo el método general descrito en el apartado anterior y particularmente en la publicación presentada en el Apéndice, se fabrican microcápsulas con distintas grasas de peces y con aceite de hígado de bacalao (AHB) para comprobar el éxito de su fabricación.

Además, también se fabrican microcápsulas que incorporan aceite de oliva y ácido araquidónico deuterado, que son empleadas para confirmar la eficacia de su fabricación así como el de su almacenamiento.

➤ MICROCÁPSULAS CON DISTINTAS GRASAS Y ACEITES

Las micropartículas que contienen distintas grasas (atún, caballa y sardina) y aceite de hígado de bacalao, suministrados por ANFACO, se prepararon en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo.

De las grasas y aceite se recogen alícuotas así como de las microcápsulas para analizar su composición en ácidos grasos. De esta forma se pueden estudiar sus posibles pérdidas de incorporación durante el proceso de fabricación.

➤ MICROCÁPSULAS CON ACEITE DE OLIVA Y *AA

En relación a las microcápsulas con una mezcla lipídica de aceite de oliva (mayoritario en ácido oleico [18:1(n-9)]) y ácido araquidónico deuterado [*AA, 20:4(n-6)-d₈], en las proporciones 90:10, se fabrica un lote (en el año 2002) también en Ribadeo (CIMA), para realizar estas primeras confirmaciones.

El ácido araquidónico deuterado (FA-503 Arachidonic acid-5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-d₈) es suministrado por BIOMOL[®] Research Laboratory, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA).

Del aceite de oliva y del *AA se tomaron alícuotas antes de ser encapsulados, igualmente se recogen de las microcápsulas al inicio y durante su almacenamiento (21 días). Al analizar el ácido araquidónico deuterado obtenemos información de su tiempo de retención, necesario para poder identificarlo en las sucesivas analíticas de ácidos grasos.

2.- PARA CONFIRMAR INGESTIÓN Y DIGESTIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS

Confirmada la fabricación y almacenamiento, el segundo punto a comprobar es su posible ingestión y digestión por parte de las larvas de almeja babosa.

➤ MICROCÁPSULAS CON COLORANTE DE CUBIERTA

Para ello se preparan microcápsulas con aceite de hígado de bacalao, marcándolas con un colorante de cubierta (FITC, isotiocianato de

fluoresceína), siguiendo el método descrito en la publicación del año 2002 presentada en el Apéndice.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es suministrado por Sigma® (St. Louis, MES).

Estas micropartículas se usan como alimento de larvas de almeja babosa durante 4 horas y se sigue su ingestión por observación con microscopía de fluorescencia. Se observan las larvas alimentadas durante un período de tiempo (20 minutos) y así se comprueba su digestión por desaparición de la fluorescencia una vez digeridas.

2.2.2.- In Vivo

1.- PARA CONFIRMAR LA ASIMILACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS POR LAS LARVAS

La asimilación de las microcápsulas de gelatina-acacia es el último punto a comprobar para poder utilizarlas, como suplemento alimenticio y como herramienta de trabajo en los estudios sobre metabolismo.

En este caso utilizamos las microcápsulas (*AAGAM) con aceite de oliva y ácido araquidónico deuterado [$*AA$, 20:4(n-6)- d_8] fabricadas en los años 2000 y 2002. Con ellas realizamos una experiencia rápida de 12 h y otra más larga de 24 h, en condiciones de cultivo reales.

➤ EXPERIENCIA RÁPIDA CON MICROCÁPSULAS FABRICADAS EN EL AÑO 2000 (Publicación Apéndice)

Con este primer lote de micropartículas realizamos una experiencia rápida para demostrar su asimilación. Se utilizan dos matraces con capacidad de 6 litros, con 30.000 larvas veliger de almeja babosa cada uno (5 larvas/mL).

Las larvas de un primer matraz se someten a ayuno total durante las 24 horas y a las del otro matraz se les adicionan 60 microcápsulas/ μ L. A estas últimas, se les deja con esta única alimentación durante 12 horas, momento en que se les cambia el agua y permanecen las siguientes 12 horas restantes en ayunas. Pasado este tiempo, se recogen las larvas de ambos matraces para ser analizadas.

➤ EXPERIENCIA DE 24 HORAS CON MICROCÁPSULAS FABRICADAS EN EL AÑO 2002

Efectuamos con estas nuevas microcápsulas una segunda experiencia más larga (24 horas) y en condiciones reales (en 6 tanques de 50 L), utilizando larvas veliger de almeja babosa de 15 días de cultivo a una densidad de 5 larvas/mL.

Las larvas de 3 tanques fueron sometidas a ayuno sirviendo de control y a los otros 3, se aportan las nuevas microcápsulas fabricadas a razón de 60 equivalentes. Transcurridas las 24 horas, se recuperan las larvas de cada tanque en un tamiz y se trasvasan a vasos de precipitado de 800 mL, para poder tomar alícuotas por triplicado.

2.- ENSAYOS COMO SUPLEMENTACIÓN NUTRICIONAL

Una vez probado que se puede conseguir una óptima fabricación de microcápsulas de gelatina-acacia, que pueden ser almacenadas en perfecto estado y que son ingeridas, digeridas y asimiladas por las larvas de *Venerupis pullastra*, resta comprobar ahora la eficacia en su uso como suplemento nutricional en los cultivos.

➤ SEGUIMIENTO DE TASAS DE CRECIMIENTO Y MORTALIDAD DE UN DESARROLLO LARVARIO CON DIETAS DE MICROALGAS Y MIXTA

Para esto se realiza una experiencia con larvas veliger tardías de almeja babosa (230 μ m de tamaño), las cuales se someten a dietas con

microalgas y dietas mixtas, utilizando las GAM de grasas de peces (atún, caballa y sardina) y de aceite de hígado de bacalao.

Se hace un seguimiento de sus tasas de crecimiento y mortalidad durante 10 días, en tanques de 200 litros de capacidad y en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior de cultivos larvarios, iniciando los cultivos a una densidad media de 2 larvas/mL (1,3-2,7 larvas/mL).

Las larvas se dividen en distintos tanques y se les aplica los tratamientos alimenticios indicados a continuación:

- Tanque 1 (Testigo): Alimentación de 20 equivalentes *Isochrysis* (20 células/ μ L de cultivo) de mezcla de microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Skeletonema*)
- Tanque 2: Alimentación con 10 equivalentes de mezcla de microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Skeletonema*) + 40 mL de una solución con microcápsulas conteniendo grasa de atún
- Tanque 3: Alimentación con 10 equivalentes de mezcla de microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Skeletonema*) + 40 mL de una solución con microcápsulas incorporando grasa de caballa
- Tanque 4: Alimentación con 10 equivalentes de mezcla de microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Skeletonema*) + 40 mL de una solución de microcápsulas con aceite de hígado de bacalao
- Tanque 5: Alimentación con 10 equivalentes de mezcla de microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Skeletonema*) + 40 mL de una solución de microcápsulas con grasa de sardina

3.- ENSAYOS COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO

Otro posible uso de las microcápsulas de gelatina-acacia es como herramienta de trabajo, bien para determinar qué sustancias pueden llegar a ser esenciales en la nutrición de moluscos bivalvos o bien, para rastrear distintos ácidos grasos y poder estudiar su metabolismo en estos organismos vivos.

➤ SEGUIMIENTO METABÓLICO DEL ÁCIDO OLEICO Y ÁCIDO ARAQUIDÓNICO DEUTERADO CON *AAGAM (Publicación Apéndice)

Se hace una prueba de seguimiento metabólico del ácido oleico [18:1(n-9)] y del ácido araquidónico deuterado [*AA, 20:4(n-6)-d₈] con las microcápsulas *AAGAM fabricadas en el año 2000.

Para ello las larvas de 17 días de edad de un cultivo de almeja baborosa, se distribuyeron en dos tanques de 150 L en una densidad de 4 larvas/mL y alimentadas diariamente con dos dietas distintas durante 7 días:

- Dieta simplemente microalgal del *M. lutheri*, *I. aff. galbana*, *S. costatum*, *C. calcitrans* y *T. suecica* en una ración de 20/20/15/ 15/10 de *Isochrysis* equivalentes (células/μL de cultivo)
- Dieta con la misma mezcla microalgal suplida con *AAGAM (5 μcáp/μL)

3.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

3.1.- De microalgas

1.- PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

Una vez conocida la concentración del cultivo de microalgas, se recoge un volumen de entre 5 y 15 mL en filtros de fibra de vidrio Whatman, GF/F de 4,5 cm de diámetro, previamente horneados a 450 °C durante 24 horas. Se lavan los filtros con 2 volúmenes de formiato amonio al 3 % para eliminar los restos de sales.

Los filtros con las microalgas se introducen en tubos de vidrio, con tapón de rosca y con teflón, sumergiéndolos en 6 mL de una solución cloroformo-metanol (2:1 v/v) y se almacenan a -20 °C, previo burbujeo con N₂, para el posterior análisis de ácidos grasos.

2.- PARA ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Las muestras de fitoplancton no se recogen en filtros sino que, una vez conocida su concentración, se somete a centrifugación un volumen determinado del cultivo obteniéndose un precipitado microalgal. Éste se lava con una solución de formiato amonio, se congela y liofiliza para su posterior procesamiento.

3.2.- De larvas y postlarvas

Normalmente los muestreos (para las analíticas y los datos de crecimiento) coinciden con los cambios de agua que se llevan a cabo a lo largo del cultivo.

1.- PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

De cada tanque, se toman muestras homogéneas y representativas a las que se les determina la concentración de los individuos presentes. Se filtran por triplicado volúmenes conocidos de estas muestras para la analítica de ácidos grasos siguiendo el mismo método que para el fitoplancton. De cada muestra obtenida se tiene conocimiento del número de ovocitos, larvas y postlarvas que se van a analizar.

2.- PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PESOS SECOS

Las muestras se recogen en tubos de plástico y se someten a centrifugación. Se retira el agua de mar y a continuación se lava el precipitado con formiato amonio almacenándolas a -20 °C para su posterior procesamiento.

3.3.- De microcápsulas

Previamente a la fabricación de las microcápsulas, se toman muestras de la fracción lipídica que se va a encapsular. Las grasas y aceites (entre 50-100 μ L) se disuelven en $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) para su posterior tratamiento y análisis por cromatografía de gases.

Con una cámara Bürker-Türk realizamos el conteo de las micropartículas, para determinar su concentración. Los datos de su tamaño se obtienen con un Analizador de Imágenes (PC_Image).

Para la analítica de sus ácidos grasos se recogen volúmenes conocidos de la solución acuosa donde están disueltas las microcápsulas, en filtros de fibra de vidrio GF/F (4,5 cm de diámetro) previamente horneados en mufla. Se hace un lavado para eliminar los posibles restos de aceites y gelatina-acacia que quedaron de la fabricación y se almacenan para su posterior análisis en cloroformo-metanol (2:1 v/v) con burbujeo de N_2 .

A las GAMs, con el aceite de oliva y el ácido graso deuterado, se les efectúa un seguimiento hasta los 21 días (día 0, 7 y 21). De esta forma se pudo comprobar su estabilidad a lo largo del almacenamiento.

4.- TOMA DE DATOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LOS CRECIMIENTOS, CÁLCULO DE DENSIDADES Y PRODUCCIONES

Los resultados de los crecimientos de los cultivos a estudiar se obtienen a partir de dos datos biométricos medidos durante los desarrollos: el peso seco y la talla.

Las tallas se obtienen por medio de un Analizador de Imagen midiendo el eje mayor (OL) y el eje menor (OB). Las muestras se toman homogenizando en un volumen fijo (500 mL) todos los individuos que se cultivan en el tanque.

Para determinar los pesos secos por larva, las muestras recogidas y congeladas, son sometidas a liofilización durante 24 horas. Después de mantenerlas en un desecador durante una hora, se pesan en una balanza (Sartorius MC 210 S) con precisión de 0,001 mg. Al haber tarado previamente el peso del tubo donde son recogidas las muestras, por diferencia, obtenemos el peso seco total de la muestra y al conocer el número de larvas recogido, podremos determinar el peso seco por individuo.

La densidad de los cultivos larvarios y postlarvarios se determina contando el número de individuos por μL de distintas alícuotas, en una lupa binocular Nikon SMZ-645. Los individuos de cada cultivo se llevan a un volumen fijo (500 mL) donde son homogenizados para retirar las alícuotas que van a tener un volumen determinado dependiendo de la concentración (25-50 μL). Con este dato podremos saber el número inicial de ovocitos al inicio del cultivo y el número de larvas que llegan al estado de fijación (número de individuos por mL de tanque de cultivo).

Para determinar la producción o rendimiento final hasta semilla mayor de 750 μm , se calcula el peso total de los individuos que llegan a esta talla y el peso por individuo. La semilla se recoge en un tamiz previamente tarado y se pesa después de eliminar el agua durante media hora. Por diferencia obtenemos el peso total; al mismo tiempo se toman muestras de 100-200 individuos que también se pesan calculando de esta forma el peso/individuo.

Al conocer el número de ovocitos de la puesta, sabemos la producción final o rendimiento del cultivo que estamos estudiando.

5.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS ALMACENADAS Y EXPRESIÓN DE LOS DATOS

1.- BIOMÉTRICOS

La media y desviación estándar del tamaño de los huevos, larvas y postlarvas, así como de las microcápsulas fabricadas, se calculan a partir de las mediciones del eje OL, siendo el número de individuos medidos \geq a 100, expresándose ($n=100$).

Los pesos secos se determinan a partir de la media y desviación de tres muestras ($n=3$) cuyo número de individuos varía dependiendo de su tamaño.

2.- DE DENSIDADES Y PRODUCCIONES

La media de las densidades de los cultivos se halló por los conteos de 10 alícuotas ($n=10$).

Se toman cinco muestras ($n=5$) para obtener el peso/individuo y calcular así la producción final de la semilla.

3.- DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA Y DE ÁCIDOS GRASOS DEL FITOPLANCTON

Los datos aportados en este trabajo de las especies de fitoplancton utilizadas como alimento (composición proteica y de ácidos grasos), se consideran como estándar o valores medios de una serie de analíticas realizadas a las microalgas cultivadas bajo las condiciones del criadero.

4.- DE LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

El número de muestras recogidas para hallar los valores medios y desviaciones estándar de los ácidos grasos de las microcápsulas, de las

fracciones lipídicas encapsuladas, de los ovocitos, de las larvas y de las postlarvas, fue de tres (n=3).

De cada muestra se toma una alícuota a la que se le realiza un procesamiento según el método que describiremos a continuación y finalmente, una sola inyección por cada una de ellas.

6.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Los **lípidos totales** se hallan por el método de Marsh y Weinstein (1966) utilizando como estándar la tripalmitina (Sigma®) en un rango de concentraciones de 5-50 µg para establecer la recta de calibración. La absorbancia se midió a 375 nm en un Espectrofotómetro (Perkin Elmer. UV/VIS. Lambda 25).

Para determinar los **carbohidratos** se cuantifica la glucosa total por el método de Dreywood (1946) empleando el reactivo de antrona-sulfúrico, siendo el estándar utilizado: D (+) glucosa anhidra (Merck®) en un rango de concentraciones de 15-105 µg para obtener la recta de calibración. La absorbancia se midió a 625 nm.

Los análisis de **proteínas** se realizan a partir del método modificado de Lowry (1951) basado en los resultados de Bensadoun y Weinstein (1976) y Hess y col. (1978). La recta de calibración se realiza utilizando como estándar la seroalbúmina bovina (Sigma®) en un rango de concentraciones de 5 a 30 µg. Para la lectura de las absorbancias se ajusta el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

7.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

7.1.- Método

Una alícuota de las muestras de microalgas, microcápsulas y larvas almacenadas en cloroformo metanol (2:1, v/v), se somete al protocolo de determinación y cuantificación de los ácidos grasos descritos por Marty y col. (1992).

En el caso de las muestras de fitoplancton y microcápsulas, se determinan los ácidos grasos de los lípidos totales, por lo que no se lleva a cabo la primera etapa de cromatografía de SPE para la separación de las fracciones neutra y polar (LN Y LP).

Los reactivos utilizados son: gel de sílice 60, Merck®; borotri-fluoruro-metanol (solución al 15 % m/m), Merck®; disulfuro de carbono (CS₂), Merck®; metanol y cloroformo para cromatografía en fase líquida (HPLC), Merck®; n-Hexano Lichrosolv para cromatografía en fase líquida (HPLC), Merck®.

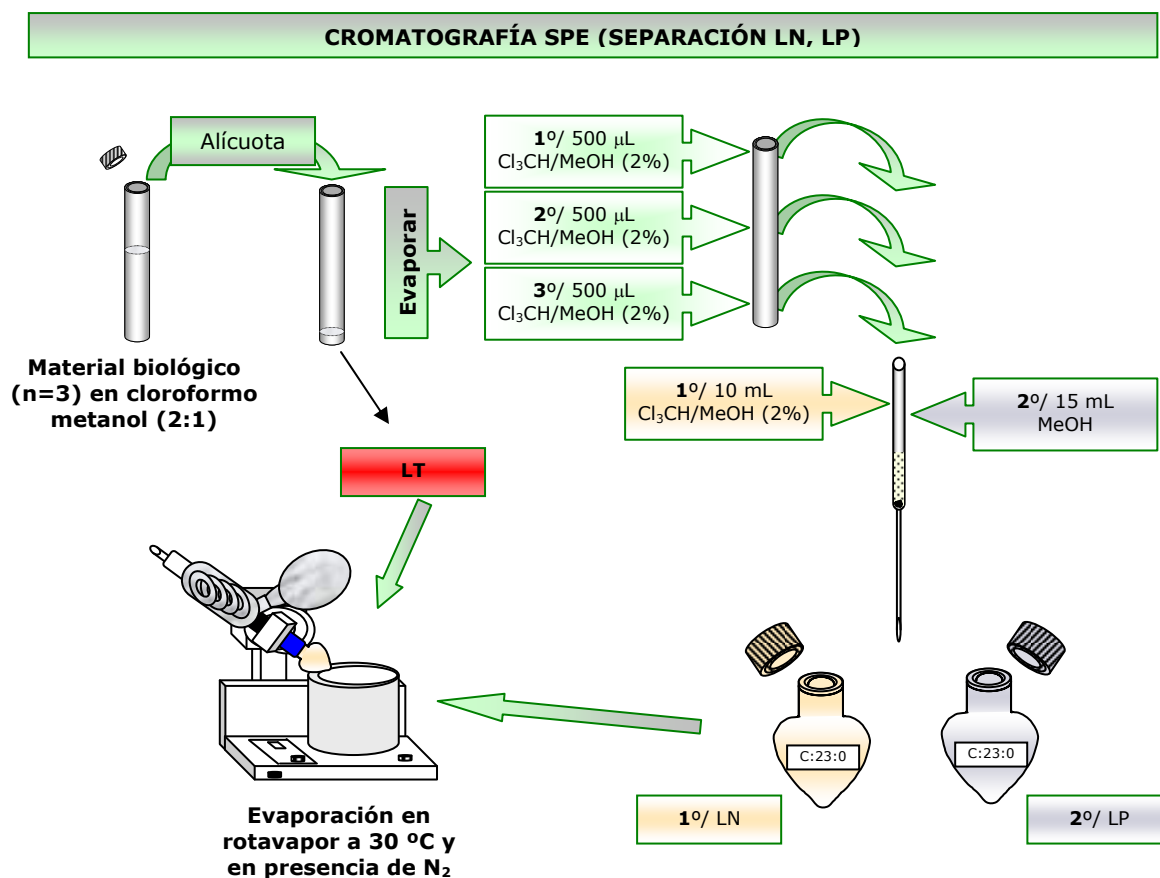
Como estándares fueron empleados: mezcla de 37 ácidos grasos metilados, Sigma® 189-19 y como patrón interno el ácido tricosanoico (C23:0), Sigma® T-6543.

7.1.1.- Cromatografía SPE (Solid phase extractive)

Se trata de extraer en un soporte sólido, los componentes de la muestra (lípidos), mediante el empleo de solventes de distinta polaridad (cloroformo-metanol al 2 % y metanol). De esta forma, se retiran secuencialmente los componentes que interesan (lípidos neutros: triglicéridos y esteroides y lípidos polares: glucolípidos y fosfolípidos).

El soporte sólido consiste en una pipeta Pasteur y la fase sólida es sílica gel (35 x 5 mm), previamente incinerada a 450 °C (24 horas) e hidra-

tada al 6 % con agua Milli-Q, de acuerdo al método descrito por Marty y col. (1992).



Esquema del método de Cromatografía Solid phase extractive.

7.1.2.- Metilación

Los ácidos grasos con cadenas iguales o superiores a 6 átomos de carbono, no son lo suficientemente volátiles para examinarlos fácilmente por cromatografía de gases y por ello, deben ser esterificados.

La esterificación les proporciona un grupo metilo que les confiere una menor polaridad y una mayor volatilidad. Por lo tanto las muestras deben ser hidrolizadas y transesterificadas previamente, lo que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES).

La transesterificación y metilación ácido catalizada se lleva a cabo, con el reactivo trifluoruro de boro-metanol (15 % m/m) con ciertas modificaciones al método propuesto por Metcalfe y Schmitz (1961). El uso de este reactivo es recomendado para la preparación de FAMES por la British Standard Institution (BSI), la International Standards Organization (ISO), la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y la American Oil Chemists' Society (AOCS), entre otros (Lumley, 2001).

Una vez obtenidos los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se extraen y purifican de acuerdo al método descrito por Marty y col. (1992).

7.1.3.- Análisis por cromatografía en fase gaseosa

La fase orgánica obtenida que contiene los ácidos grasos esterificados, se concentra al vacío y con borboteo de nitrógeno para evitar oxidaciones, resuspendiéndose en un volumen fijo de n-hexano e inyectándose 1 μ L de la solución en un cromatógrafo de gases.

El cromatógrafo de gases empleado es un Hewlett Packard GC System mod. 6890, equipado con un inyector tipo split/splitless y un detector de ionización de llama (FID).

Los ácidos grasos se separaron con una columna capilar, HP-INNOWax[®] (30 m x 0,25 mm DI y 0,25 μ m de espesor). Dicha columna consta de una fase estacionaria de tipo polar ligada, constituida por polietilen glicol (similar a las Carbowax[®]), cuyas temperaturas límite de trabajo están comprendidas entre 50 y 260 °C.

Como gas transportador se empleó el hidrógeno a un flujo de 1 mL/min.

Las condiciones cromatográficas se detallan a continuación:

Condiciones cromatográficas

Inyector	Pulsed splitless
Gas portador	H ₂ , flujo constante
Temperatura columna	Rampa. Figura 10.
Temperatura inyector	220 °C
Temperatura detector	240 °C
Detector	FID

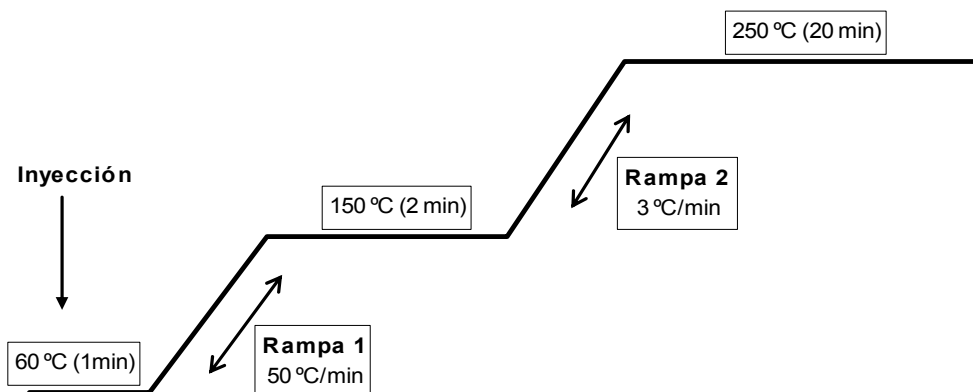


Fig. 10: Representación de las rampas de temperatura del horno.

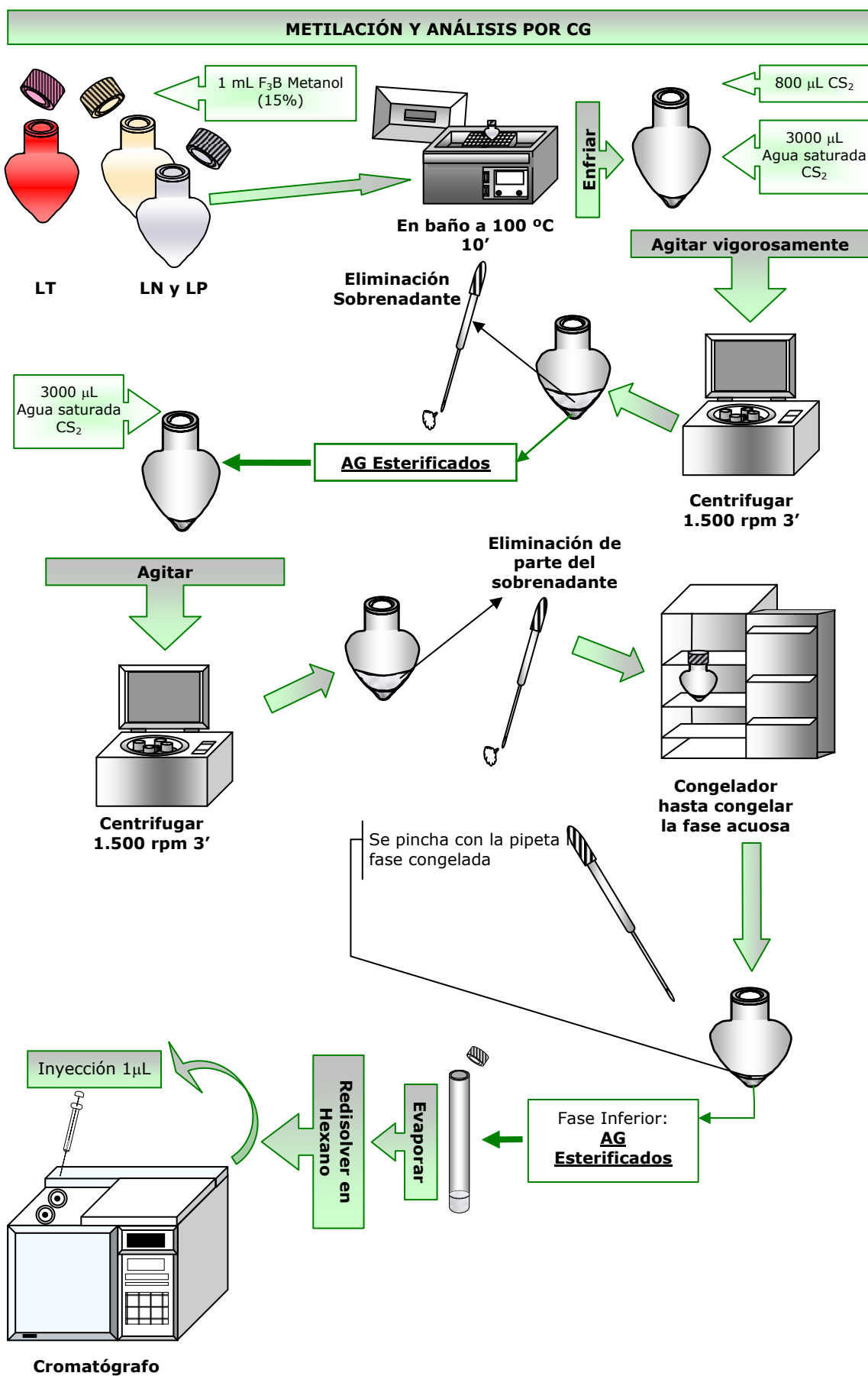
Los picos obtenidos se identifican comparando sus tiempos de retención con una patrón estándar (Sigma[®] 189-19), consistente en una mezcla de 37 ácidos grasos metilados y además, se utilizan extractos lipídicos de tres microalgas *Paulova lutheri*, *Skeletonema costatum* e *Isochrysis aff. galbana*, clon T-iso cuyas composiciones en ácidos grasos son conocidas (Delaunay, 1992).

La cuantificación de los distintos ácidos grasos se hace mediante sus rectas de calibración, empleando para ello, la mezcla de ácidos grasos del patrón estándar a distintas concentraciones. Se determinaron a partir de la

inyección por duplicado de 50, 125, 250 y 500 ng de dicho patrón diluido en hexano.

Además se hace necesaria la utilización de un ácido graso elegido como patrón interno (ácido tricosanoico, C23:0), que no se encuentra presente en los organismos marinos.

Por último, la reproducibilidad cromatográfica en las condiciones analíticas utilizadas es en torno a un 90 % para un microgramo de muestra, atribuyéndose los errores (10 %) a las manipulaciones debidas al proceso de metilación de las muestras y a su inyección en el cromatógrafo. Estas pérdidas se incrementan a un 20 % cuando se tienen en cuenta los procesos de extracción (SPE) para separar los lípidos neutros y polares.



Esquema de metilación de ácidos grasos y su análisis por cromatografía gaseosa.

7.2.- Principales ácidos grasos identificados

Los principales ácidos grasos identificados por nuestro método se exponen en la Tabla VI, su espectro aparece representado en el cromatograma de la Figura 11.

Tabla VI: Principales ácidos grasos identificados y separados.

Abreviatura	Nomenclatura Sistemática	Nombre Común
iso-17:0	AC isoheptadecanoico	
12:0	AC dodecanoico	AC láurico
13:0	AC tridecanoico	
14:0	AC tetradecanoico	AC mirístico
15:0	AC pentadecanoico	
16:0	AC hexadecanoico	AC palmítico
17:0	AC heptadecanoico	AC margárico
18:0	AC octadecanoico	AC esteárico
19:0	AC nonadecanoico	
23:0	AC tricosanoico	
16:0 dma	AC hexadecanoico-dimetil acetal	
17:0 dma	AC heptadecanoico-dimetil acetal	
18:0 dma	AC octadecanoico-dimetil acetal	
16:1(n-5)	AC 11-hexadecenoico	
16:1(n-9)	AC 7-hexadecenoico	
16:1(n-7)	AC 9-hexadecenoico	AC palmitoleico
18:1(n-7)	AC 11-octadecenoico	AC vaccénico
18:1(n-9)	AC 9-octadecenoico	AC oleico
20:1(n-9)	AC 11-eicosenoico	
20:1(n-11)	AC 9-eicosenoico	
20:1(n-7)	AC 13-eicosenoico	
18:2(n-6)	AC 9,12-octadecadienoico	AC linoleico (LA)
18:3(n-3)	AC 6,9,12-octadecatrienoico	AC α -linolénico (LNA)
18:3(n-6)	AC 9,12,15-octadecatrienoico	AC γ -linolénico
18:4(n-3)	AC 6,9,12,15-octadecatetraenoico	
21:4(n-6)	AC 6,9,12,15-heneicosatetraenoico	
21:5(n-3)	AC 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoico	
20:2(n-6)	AC 11,14-eicosadienoico	
20:3(n-3)	AC 11,14,17-eicosatrienoico	AC homogamma linolénico
20:3(n-6)	AC 8,11,14-eicosatrienoico	AC dihomo linolénico
20:4(n-6)	AC 5,8,11,14-eicosatetraenoico	AC araquidónico (ARA)
20:4(n-3)	AC 8,11,14,17-eicosatetraenoico	
20:5(n-3)	AC 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	AC eicosapentanoico (EPA)
22:4(n-6)	AC 7,10,13,16-docosatetraenoico	
22:5(n-6)	AC 4,7,10,13,16-docosapentaenoico	AC docosapentaenoico
22:5(n-3)	AC 7,10,13,16,19-docosapentaenoico	AC clupanodónico
22:6(n-3)	AC 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	AC docosahexaenoico (DHA)
20:2i (20:2(5,11))	Ácido graso no saturado metileno no interrumpido NMIFAS	
20:2j (20:2(5,13))	Ácido graso no saturado metileno no interrumpido NMIFAS	
22:2i (20:2(7,13))	Ácido graso no saturado metileno no interrumpido NMIFAS	
22:2j (20:2(7,15))	Ácido graso no saturado metileno no interrumpido NMIFAS	

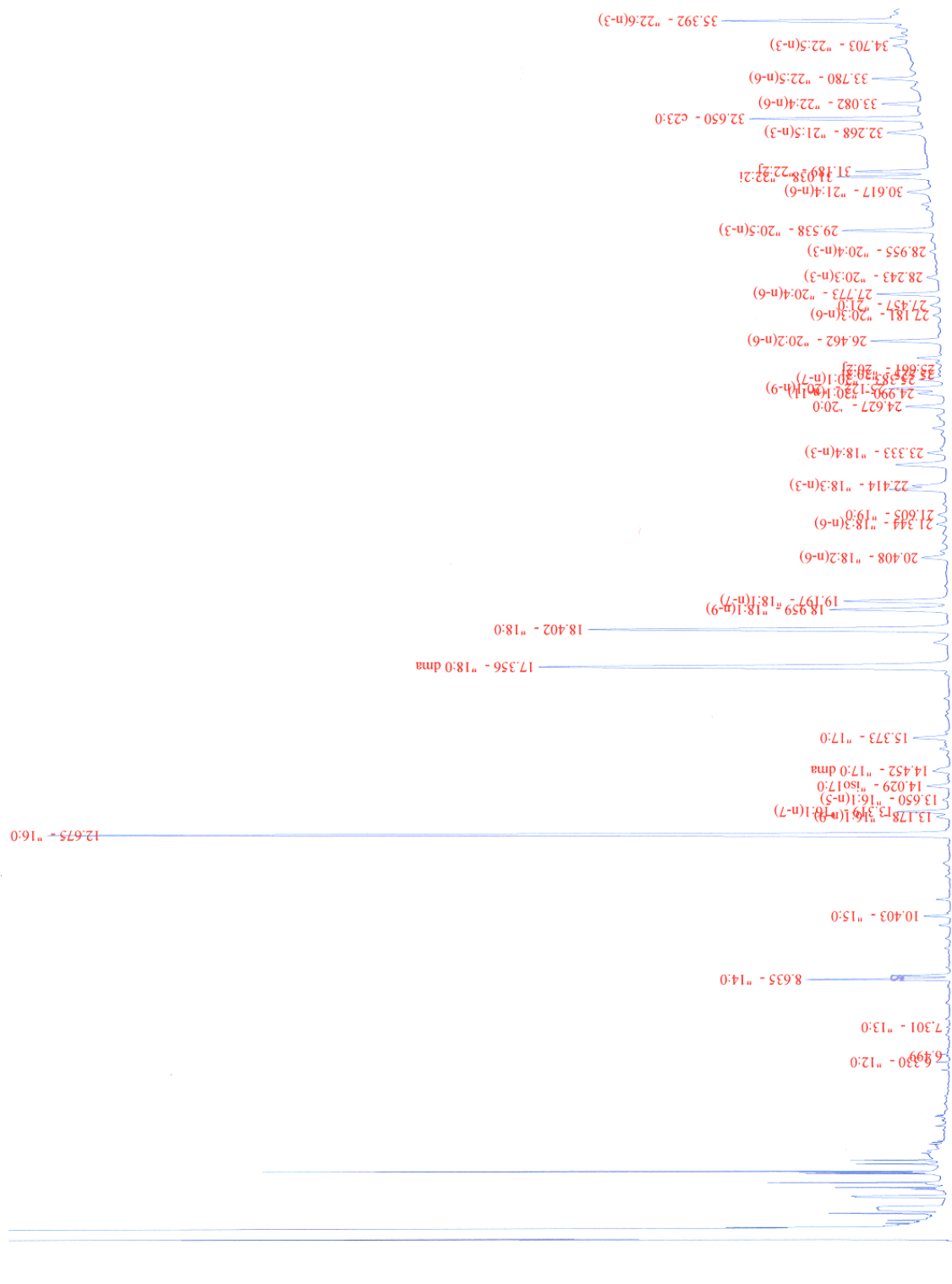


Fig. 11: Cromatograma obtenido tras la separación en Cromatógrafo de gases de los ácidos grasos esterificados.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- DESARROLLOS LARVARIOS

1.1.- Calidades de la puesta

1.1.1.- Rendimiento y características de una puesta estándar

Teniendo en cuenta nuestra experiencia con diferentes cultivos de almeja babosa, podemos indicar que entre un 15-20 % de los reproductores hembras recogidos en el medio natural realizan la puesta en el Centro.

De este porcentaje de adultos maduros que llegan a desovar en el criadero, encontramos diferencias importantes en el tamaño de las puestas, lo que nos podría permitir hacer una primera valoración de los cultivos de almeja babosa.

Para corroborar estos datos, realizamos una experiencia con progenitores recogidos en el banco natural de la Ría de Pontedeume durante el mes de febrero en estado de madurez y puesta. Los ovocitos obtenidos solo nos sirvieron para contabilizarlos y analizarlos biométricamente, pero no se les hizo el seguimiento de su cultivo.



Al criadero llegaron aproximadamente 100 individuos de los que se obtuvo una puesta espontánea. Recogimos las hembras (17) que colocamos

en un vaso de precipitado durante 2 horas, logrando 9.375.000 ovocitos (Tabla VII).

Tabla VII: Datos de tamaño y peso de diecisiete hembras aisladas de aproximadamente 100 individuos llegados del medio natural (Ría de Pontedeume) al criadero.

	Nº	Largo (mm)	Alto (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)
REPRODUCTORES	100				
	17 ♀	40,01 ±3,01	26,25 ±2,14	18,14 ±1,72	11,48 ±2,79
Puesta Durante 2 Horas	9.375.000 Huevos				

Los ovocitos sin fecundar tenían forma ovoide (70,9 x 67,3 µm) y su peso seco era de 41 ng/ovocito. Al número total de ovocitos recogidos de un lote estándar de individuos (n=100) procedentes del medio marino lo denominamos **puesta/lote**, correspondiéndose en este caso, al desove de 17 hembras.

1.1.2.- Rendimientos y características de las puestas estudiadas

A lo largo de cuatro años (2000, 2001, 2002 y 2003) se realizaron en el criadero del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA), seguimientos de distintos desarrollos larvarios de almeja babosa (*Venerupis pullastra*).

Los progenitores de estos cultivos procedían de Camariñas, después de analizar los datos de tamaños de la puesta, crecimientos de las larvas, momento de la metamorfosis y producciones finales a los 22 días, nos centramos en cuatro de ellos y que definimos a continuación (Tabla VIII) al corresponderse con dos cultivos que evolucionaron bien y otros dos cuya evolución fue peor.

Tabla VIII: Características generales de las cuatro puestas analizadas.

FECHA	ORIGEN PROGENITORES	TIPO DE PUESTA	TAMAÑO PUESTA (Millones)	PESO OVOCITOS (ng/ovocito)	TAMAÑO OVOCITOS (μm)
1/16/01/02	Camariñas	Espontánea	9-15	28,07	76 x 70
2/18/02/03	Camariñas	Espontánea	9-15	47,62	76 x 69
3/18/04/00	Camariñas	Espontánea	3-5	26,76	79 x 71
4/11/06/01	Camariñas	Espontánea	3-5	5,09	72 x 67

En los cuatro cultivos estudiados, partiendo de un lote de aproximadamente 250 progenitores, observamos que en las de los años 2002 y 2003 (enero y febrero) el número de ovocitos recogidos oscila entre los 9-15 millones, mientras que en las de los años 2000 y 2001 (abril y junio), sólo se llegan a coleccionar entre 3-5 millones.

Al analizar biométricamente estos ovocitos, se encontraron también algunas diferencias:

1.- En las puestas 1 y 2 (2002 y 2003) nos encontramos con ovocitos casi iguales (75,8-76,1 μm para el eje OL (eje mayor) y 68,9-70,4 μm para su eje OB (eje menor). Sin embargo, a igual tamaño de partida presentan pesos diferentes (desde 28,066 ng/ovocito, hasta 47,619 ng/ovocito, aproximadamente un 1,7 veces más)

2.- En los cultivos 3 y 4 (2000 y 2001) se aprecian diferencias mucho más importantes entre los ovocitos fecundados. Por un lado ovocitos de forma ovoide de 79 x 71 μm y con un peso de 26,758 ng/ovocito, mientras que en la otra puesta, los ovocitos fecundados, son mucho más pequeños (72 x 67 μm) y su peso se aleja de los anteriores (5,093 ng/ovocito), aproximadamente 5,5 veces menos

Después de años de experiencia del equipo investigador del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA), se puede afirmar que en *Venerupis pullastra* se observan gametos maduros no atrésicos durante todo el año, con posibilidad de generar reclutamientos naturales en cualquier época del

año. Esto también se concluye en el DEA presentado por Cerviño Otero (2005), donde se hizo un estudio sobre el ciclo reproductivo de la almeja babosa en dos poblaciones de la costa gallega. Anteriormente Villalba y col. (1993), encontraron que los folículos gonadales de esta especie son activos a lo largo de todo el año.

Nuestros resultados vendrían a confirmar lo anteriormente expuesto ya que, a lo largo de los cuatro años de nuestro estudio, se consiguieron puestas espontáneas en todos los meses del año, aunque nos hayamos centrado en los obtenidos en enero, febrero, abril y junio.

Lo que nos resulta complicado de discutir es la variabilidad del número de ovocitos obtenidos en las puestas dado que, los progenitores son traídos del medio natural y no tenemos conocimiento de si hubo otra emisión de gametos cercana al momento de la llegada al criadero, ni tampoco de las condiciones en las que están las gónadas. Si esto fuera así, podemos explicar por qué la cantidad de ovocitos colectados en los meses de abril y junio es de ± 3 millones mientras que, en los meses de enero y febrero llega a 9-15 millones. En consecuencia, se hace difícil afirmar que el tamaño de las puestas es indicativo de un futuro desarrollo larvario de buena calidad.

Dado que es una especie con puestas continuadas en el tiempo, el dato expuesto en los resultados de la cantidad de ovocitos obtenida de 17 hembras a lo largo de dos horas (puesta/lote = 9.375.000), nos da una visión parcial de su estrategia pero no contundente. Realizando cálculos con estos datos podemos intuir un tamaño de puesta de aproximadamente 550.000 ovocitos por hembra, lo que supondría la mitad de lo que desova la almeja fina (1.020.000 ovocitos) según Pérez Camacho y col. (1977), aunque en el criadero de Ribadeo, la variabilidad en las puestas de esta misma especie (*Tapes decussatus*) es muy alta (500.000-2.000.000 de ovocitos).

El tamaño de los ovocitos de almeja babosa varía entre 72-79 μm , dato que se asemeja al de especies como la almeja fina (Pérez Camacho y

col., 1977) y *Ensis arcuatus* (Da Costa, comunicación personal) pero lo diferencia de otras especies de solénidos como *Ensis siliqua* (90-100 μm) y *Solen marginatus* (135-140 μm) (Martínez, 2002; Martínez y col., 2000), claramente mayores.

1.2.- Calidades de los desarrollos larvarios

1.2.1.- Crecimiento y rendimiento en una puesta estándar

Se hizo una experiencia con una puesta estándar distinta a la anterior para realizar el seguimiento completo del cultivo hasta semilla, retenida en tamices con luz de malla de 750 μm , estimando así su producción.

Cuando se trasladan al laboratorio 257 reproductores del medio natural (Camariñas), se efectúa un seguimiento de las puestas conseguidas en un período de 7 días.

Durante éste tiempo se produjeron dos puestas espontáneas que, después de contar el número de ovocitos totales obtenidos (28.175.000), cultivamos de la misma forma descrita en el capítulo de Material y Métodos hasta llegar aproximadamente a los dos meses.

Finalizado este tiempo, contabilizamos los individuos retenidos en tamices de 750 μm (>750 μm). Como resultado conseguimos 7.244.278 individuos de esta talla, lo que supone una producción de un 26 % (Tabla IX).

Tabla IX: Producción de semilla >750 µm de almeja babosa obtenida en criadero a lo largo de dos meses, de dos puestas espontáneas de 257 progenitores.

PROGENITORES 257		750 µm	PRODUCCIÓN
Puesta 1	20.000.000		
Puesta 2	8.175.000	7.244.278	26 %
TOTAL	28.175.000		

Por otra parte, la Figura 12 representa los datos del crecimiento en longitud de la concha (eje OL) de varios desarrollos larvarios de almeja babosa.

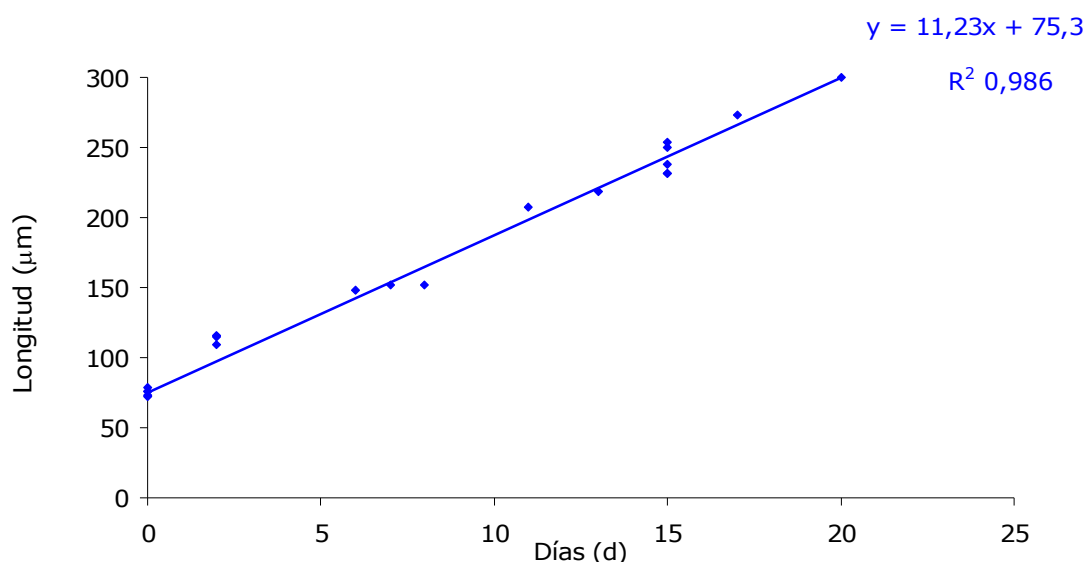


Fig. 12: Crecimiento en longitud de la concha de *Venerupis pullastra* durante su desarrollo larvario de 22 días en un cultivo estándar.

El crecimiento de ésta especie se inicia con una talla media de ovocito fecundado de 75,3 µm y se llega a longitudes de concha de 322 µm en 22 días. El crecimiento diario obtenido es de 11,23 µm/día, lo que se ajusta a una recta de regresión lineal del tipo $y = mx+b$, obteniéndose un valor alto del coeficiente de regresión ($R^2 = 0,986$).

1.2.2.- Crecimiento y rendimiento en las puestas estudiadas

Según los datos de crecimiento de las larvas, así como el momento en que comienza la formación del pie, nos permiten hacer la clasificación de las cuatro puestas descritas anteriormente en dos grupos, uno que catalogamos como desarrollos o cultivos buenos (1 y 2) y el otro al que llamaremos desarrollos o cultivos malos (3 y 4).

DESARROLLOS BUENOS	1/ Bueno: Desove 16/01/02 De Camariñas Llegadas 15/01/02
	2/ Mejor: Desove 18/02/03 De Camariñas Llegadas 17/02/03
DESARROLLOS MALOS	3/ Peor: Desove 18/04/00 De Camariñas Llegadas 18/04/00
	4/ Malo: Desove 11/06/01 De Camariñas Llegadas 31/05/01

En la Figura 13, se representan los datos de crecimientos en concha (OL) y el día en el que las larvas de las cuatro puestas se encuentran listas para la metamorfosis (> 50 % larvas pediveliger).

Se observa que los crecimientos de los cuatro cultivos son diferentes reflejando la clasificación anteriormente citada. Esta gráfica también nos muestra como los cultivos, con un buen desarrollo larvario, realizan la metamorfosis o fijación entre los 13-15 días, mientras que los cultivos malos, no lo hacen hasta los 18-22 días.

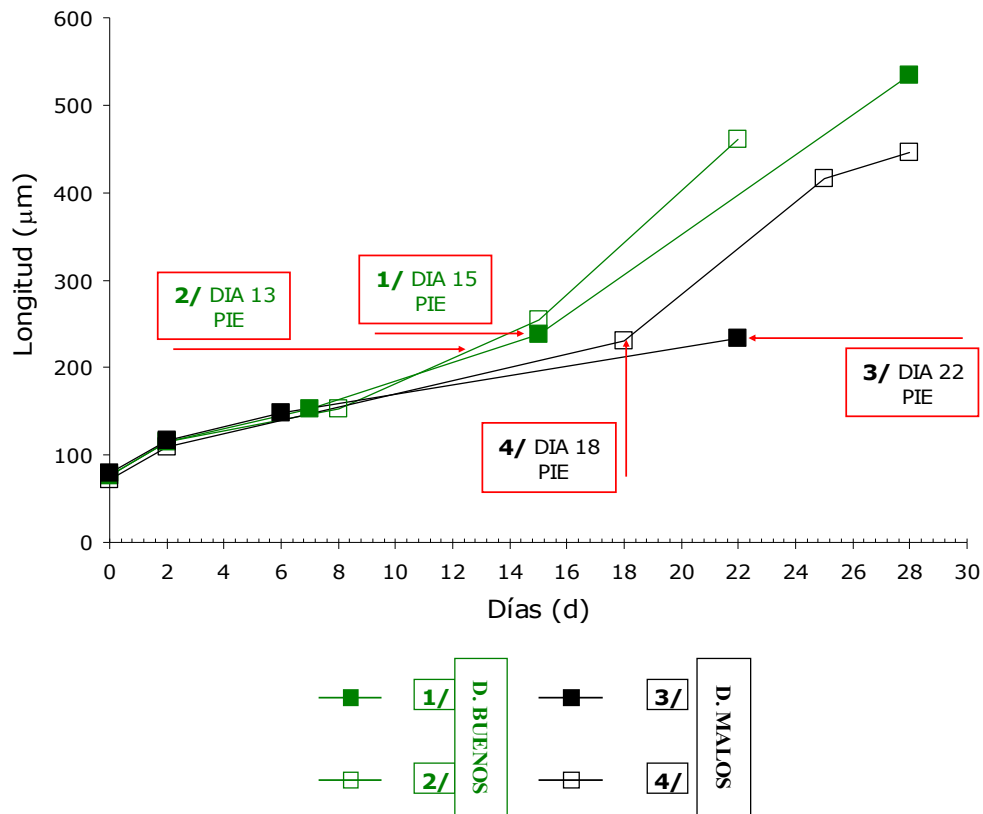


Fig. 13: Representación gráfica del crecimiento larvario de las cuatro puestas analizadas.

La Figura 14 representa mediante una secuencia de fotografías, tomadas a distintos aumentos, las diferencias de tamaños a lo largo de los desarrollos larvarios del cultivo mejor (2) y el cultivo peor (3), desde ovocito a postlarva.

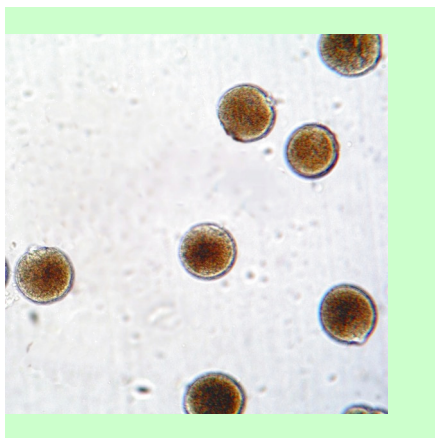
Para estos cultivos las larvas D miden entre 115-116 µm y les aparece el umbo a los 8-6 días del nacimiento con unas tallas entre 152-148 µm. El rango superior corresponde al cultivo bueno y el inferior al peor. Las diferencias visuales importantes comienzan a apreciarse a partir de este momento.

A los quince días el cultivo con mejores crecimientos alcanza la talla de 254 µm y está ya en fase pediveliger desde los 13 días. Sin embargo, el cultivo con peores resultados, alcanza esta fase a los 22 días con tan solo 234 µm. Al final del seguimiento (22 días) el cultivo 2 tiene el doble de talla que el 3 (461 µm frente a 234 µm).

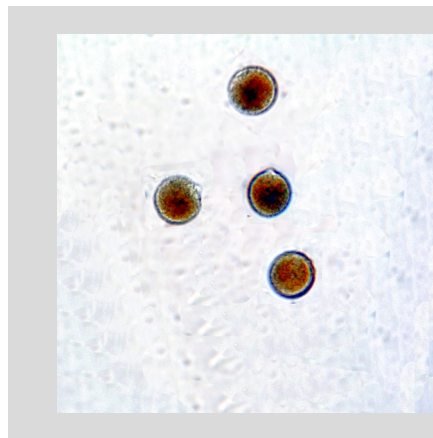
DESARROLLO MEJOR (2)

DESARROLLO PEOR (3)

OVOCITOS

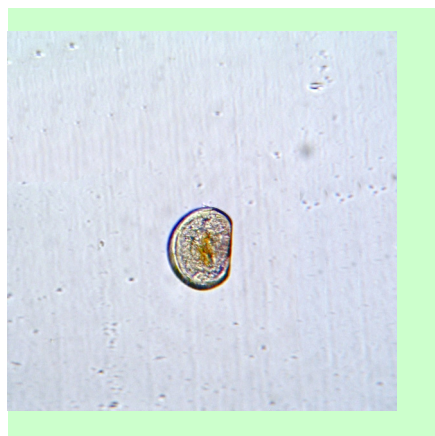


OVOCITOS 76 μm



OVOCITOS 79 μm

LARVAS D

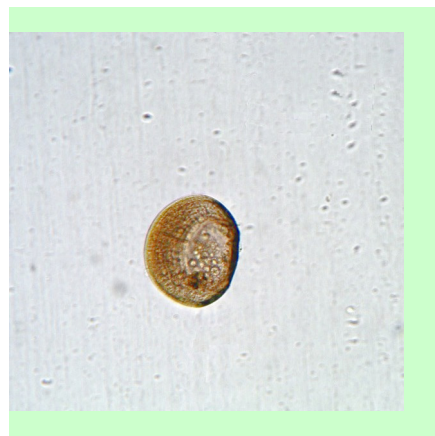


LARVA 2 días 115 μm



LARVA 2 días 116 μm

LARVAS VELIGER



LARVA 8 días 152 μm

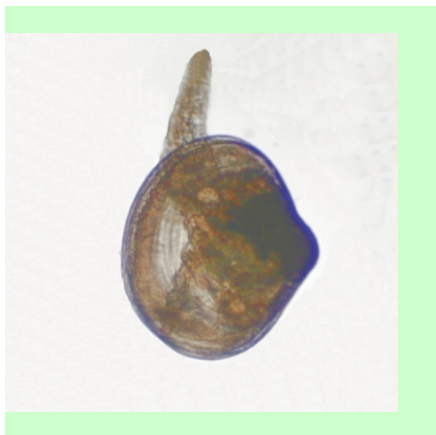


LARVA 6 días 148 μm

DESARROLLO MEJOR (2)

DESARROLLO PEOR (3)

LARVAS PEDIVELIGER

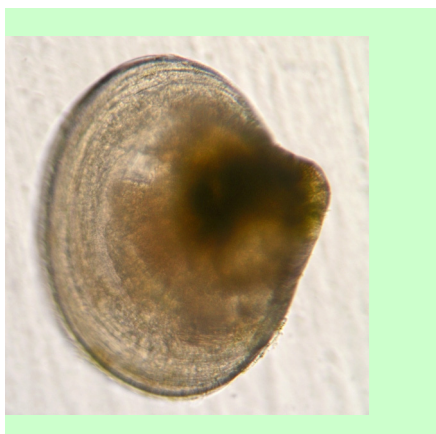


LARVA 15 días 254 μm



LARVA 22 días 234 μm

POSTLARVAS



LARVA 22 días 461 μm

Fig. 14: Serie de fotografías a distintos aumentos de los desarrollos larvarios y postlarvarios de los cultivos 2 y 3.

En la Figura 15 representamos los datos de crecimientos en longitud de la concha del cultivo mejor (en verde), del cultivo peor (en negro) y del estándar (en azul). También muestra la duración, en cada uno, del desarrollo larvario y del postlarvario.

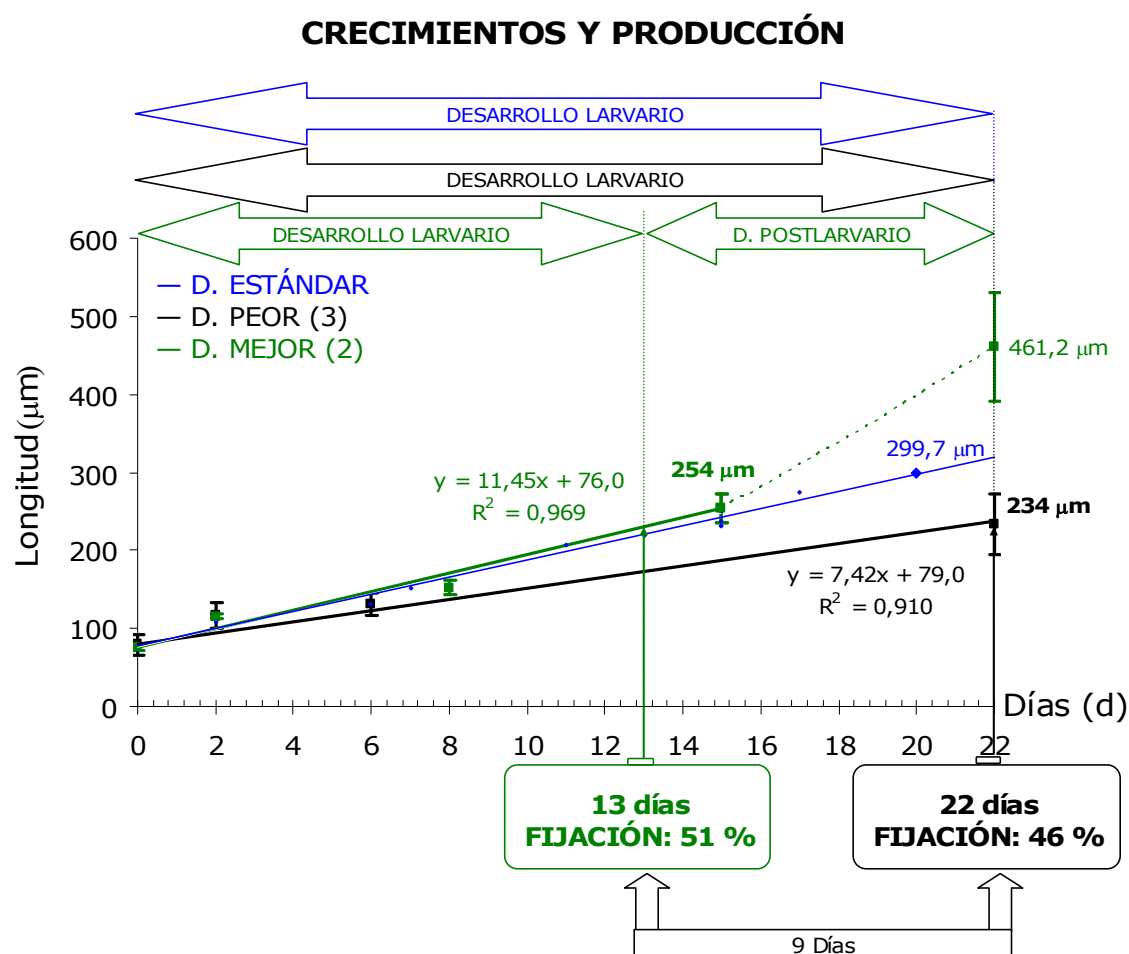


Fig. 15: Representación lineal de los crecimientos en longitud de la concha (en μm) del desarrollo mejor, del desarrollo peor y del cultivo estándar. Tiempo transcurrido desde la fecundación hasta la fijación en los cultivos (2 y 3) y su porcentaje de fijación.

En los tres desarrollos larvarios (mejor, peor y estándar) obtuvimos crecimientos que se ajustaban bien a una recta lineal. Sin embargo la fase larvaria y por lo tanto la linealidad, en los cultivos peor y estándar, se prolonga hasta el día 22, frente al cultivo mejor en el que esta fase finaliza a los 13 días, comenzando el desarrollo postlarvario con una recta que se ajusta a una ecuación potencial. La talla de fijación de los tres cultivos es de: 225 μm , 234 μm y 300 μm .

Según nuestros datos, el % conseguido de larvas listas para la metamorfosis (desde los ovocitos) en los dos cultivos es muy parecido (51 % en el mejor y 46 % en el peor). Sin embargo es destacable la diferencia en

el tiempo necesario para llegar a este estado, que es de 9 días a favor del cultivo mejor.

La linealidad a lo largo de los desarrollos larvarios coincide con diferentes estudios sobre crecimientos de varias especies de bivalvos: *Mytilus edulis* (Bayne, 1965); *Mytilus galloprovincialis* (Sedano, 1992); *Ostrea edulis* (Román, 1989) y en *Ensis siliqua* y *Ensis arcuatus* (Martínez y col., 2000; Darriba y col., 2002). En *Solen marginatus* (Da Costa DEA, 2004) se observó, al igual que en el cultivo mejor de almeja babosa, que el desarrollo postlarvario se ajusta a un modelo potencial.

La fase de fijación podemos compararla con la almeja fina (*Tapes decussatus*). Según estudios realizados por Martínez y col. (2001) muestran que esta especie, alcanza una talla de 240 µm pero necesita más tiempo para llegar a la metamorfosis (22-25 días).

1.3.- Calidad del alimento

1.3.1.- Datos en proteínas y ácidos grasos de las especies fitoplanctónicas utilizadas habitualmente como alimento

El requerimiento nutricional mayoritario en los cultivos larvarios es el de proteínas. Un buen aporte de este compuesto es fundamental para el crecimiento de las larvas en el momento de ser cultivadas.

En la Tabla IX se muestran los contenidos de este compuesto bioquímico de todas las especies utilizadas en las dietas suministradas a los distintos cultivos larvarios.

Tabla IX: Porcentajes de proteínas sobre el total de materia seca y cantidad (pg/cél) de las microalgas utilizadas en las dietas.

	<i>Mn</i>	<i>Ig</i>	<i>Cht</i>	<i>Sk</i>	<i>Ts</i>
Proteína (%)	45	37	25	25	35
Proteína (pg/cél)	13,5	13,0	10,0	12,5	52,5
Largo (µm)	5,8	5,5	6,4-10,2	7,1	13,9
Ancho (µm)	5,2	4,8	3,9-4,6	5	9,3

Las especies con mayor % proteico, con respecto a su peso seco, son: *Monochrysis*, *Isochrysis* y *Tetraselmis* (45 %, 37 % y 35 %) y las de menor porcentaje son las diatomeas con sólo el 25 %. Esta diferencia, aproximadamente de un 10 %, se debe al alto contenido en cenizas de estas microalgas marinas (Brown y col., 1989) provocado por la presencia de una cubierta silícica.

La cantidad de proteínas (pg/cél) va a estar relacionada con el tamaño de la célula de cada especie, por lo tanto, la que mayor composición proteica presenta es *Tetraselmis* (53 pg/cél frente a 10-13,5 pg/cél) por ser la de mayor tamaño (13,9 µm x 9,3 µm frente 5,5-10,2 µm x 3,9-5,2 µm).

Nuestros datos se corresponden a las microalgas cultivadas en matraz, en las condiciones descritas en el capítulo de Material y Métodos. Esto debe de tenerse en cuenta dado que, la composición bioquímica y por lo tanto, el valor alimenticio de las microalgas, puede variar considerablemente según las condiciones de su cultivo. Herrero y col. (1991) lo demuestra con distintas especies de fitoplancton utilizando distintos medios de cultivo. En este estudio el contenido proteico por célula, se considera como el más susceptible a la variación del medio utilizado. Los sistemas empleados también provocan variaciones en su calidad nutritiva (Ojea y col., 1999).

Otro componente bioquímico importante son los lípidos y dentro de estos, los ácidos grasos, van a jugar un papel fundamental en los cultivos

larvarios, al ser fuente de energía en períodos de ayuno así como fuente de sillares estructurales para la construcción de biomembranas.

En la Figura 16 se representan los porcentajes de las familias de ácidos grasos saturados (SAFAs), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) de las microalgas cultivadas en matraz y utilizadas en las dietas empleadas para los desarrollos larvarios objeto de estudio.

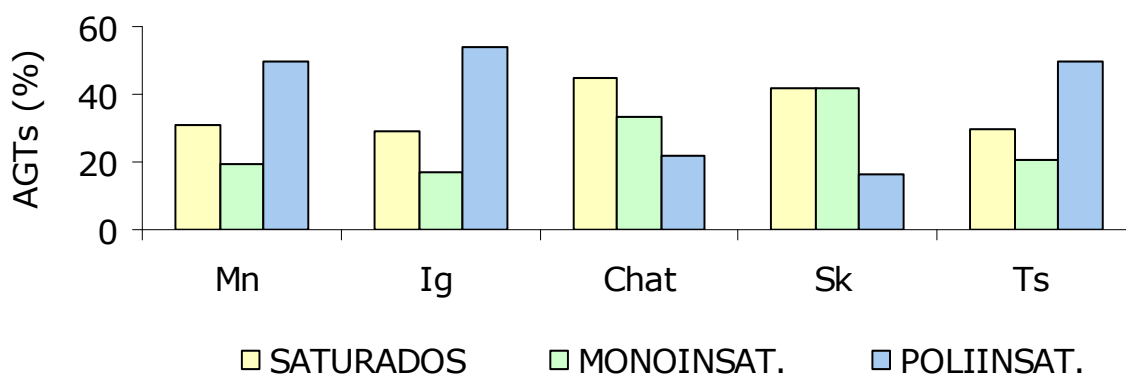


Fig. 16: Representación de los porcentajes de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las microalgas utilizadas en la alimentación de los cultivos larvarios.

Las especies de fitoplancton *Monochrysis*, *Isochrysis* y *Tetraselmis* muestran una proporción alta de PUFAs (49,6-53,9 %), seguidos de los SAFAs (29,2-31,2 %) y los MUFAs (16,9-20,8 %).

En las diatomeas (*Chaetoceros* y *Skeletonema*), son mayoritarios los ácidos grasos saturados (41,9-44,9 %) y también destacan los valores de monoinsaturados (33,5-41,9 %) mientras que, los poliinsaturados están en un porcentaje mucho menor (16,3-21,8 %).

En la Tabla X se dan los datos en porcentajes y en pg/célula, de los contenidos en ácidos grasos mayoritarios de las cinco especies de fitoplancton analizadas y empleadas en la alimentación. Estos datos son las medias de distintos análisis realizados en el criadero a lo largo de varios años, por lo que pueden considerarse como valores estándar de las especies cultivadas bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla X: Valor estándar de la composición en ácidos grasos de las microalgas utilizadas en las dietas de los desarrollos larvarios estudiados. Los datos se expresan en % y pg/cél.

Ácidos Grasos	(%)					(pg/cél)				
	Mn	Ig	Cht	Sk	Ts	Mn	Ig	Cht	Sk	Ts
14:0	20,2	19,1	32,3	27,1	0,6	0,453	0,332	1,261	0,246	0,033
16:0	10,6	9,7	10,8	13,9	28,2	0,237	0,168	0,420	0,126	1,519
18:0	0,4	0,5	1,8	0,9	0,6	0,010	0,008	0,070	0,008	0,032
16:1(n-9)	0,2	0,2	0,04	0,3	1,7	0,004	0,004	0,001	0,003	0,093
16:1(n-7)	5,5	6,4	31,7	33,8	0,5	0,124	0,111	1,236	0,307	0,029
18:1(n-9)	11,8	8,8	0,9	5,7	13,6	0,265	0,153	0,034	0,052	0,733
18:1(n-7)	1,7	1,4	0,9	2,1	3,4	0,037	0,025	0,035	0,019	0,184
20:1(n-9)	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	0,080
18:2(n-6)	9,7	7,7	0,7	3,4	4,9	0,217	0,133	0,026	0,031	0,263
18:3(n-6)	0,8	0,7	1,3	1,0	0,2	0,018	0,013	0,051	0,009	0,013
18:3(n-3)	11,1	10,9	0,0	1,0	15,1	0,248	0,189	0,000	0,009	0,812
18:4(n-3)	12,4	19,5	0,3	2,1	12,1	0,279	0,338	0,013	0,019	0,649
20:2(n-6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4(n-6)	-	0,1	4,0	-	0,3	-	0,002	0,155	-	0,015
20:5(n-3)	0,6	0,7	13,7	4,4	12,9	0,012	0,013	0,534	0,040	0,694
21:4(n-6)	0,2	0,6	0,1	0,6	-	0,005	0,010	0,004	0,005	-
22:4(n-6)	0,1	0,05	-	-	0,5	0,002	0,001	-	-	0,025
22:5(n-6)	1,7	1,5	-	0,6	-	0,037	0,026	-	0,006	-
22:5(n-3)	0,1	0,1	0,1	0,7	3,8	0,003	0,001	0,005	0,006	0,207
22:6(n-3)	13,1	12,1	1,5	2,5	-	0,293	0,210	0,057	0,023	-
SATURADOS	31,2	29,2	44,9	41,8	29,4	0,700	0,508	1,751	0,380	1,584
MONOINSAT.	19,2	16,9	33,5	41,9	20,8	0,431	0,293	1,307	0,380	1,119
POLIINSAT.	49,6	53,9	21,7	16,3	49,8	1,113	0,936	0,846	0,148	2,679
Tot. (n-6)	12,4	10,6	6,0	5,6	5,9	0,278	0,185	0,236	0,051	0,316
Tot. (n-3)	37,2	43,3	15,6	10,7	43,9	0,835	0,751	0,610	0,097	2,362
(n-3)/(n-6)						3,006	4,064	2,589	1,914	7,464
Tot. pg/cél						2,244	1,737	3,904	0,908	5,382

En *M. lutheri* encontramos datos de 2,24 pg de ácidos grasos por célula y los ácidos grasos que destacan son el 14:0 y el 16:0 entre los SAFAs, el 18:1(n-9) dentro de los MUFAs, el 18:2(n-6) entre los PUFAs $\omega 6$ y entre los PUFAs $\omega 3$ el 18:3(n-3), el 18:4(n-3) y 22:6(n-3). Esta especie es una de las que aporta mayor contenido en DHA (0,293 pg/cél).

Las células de *I. galbana* suministran 1,74 pg/cél de ácidos grasos totales. Los principales ácidos grasos en este caso también son: el 14:0 y el 16:0 entre los SAFAs, el 16:1(n-7) y 18:1(n-9) entre los MUFAs; encontrando los mismos PUFAs ω 3 y ω 6 que en la especie anterior. Esta microalga aporta DHA en cantidades elevadas (0,210 pg/cél).

T. suecica al ser una microalga de mayor tamaño, tiene mayores contenidos en ácidos grasos (5,38 pg/cél). Destacan el 16:0 entre los SAFAs, entre los MUFAs el 18:1(n-9), el 18:2(n-6) entre los PUFAs ω 6 y sobretodo el 20:5(n-3) entre los PUFAs ω 3. De EPA se proporcionan 0,694 pg/cél, sin embargo esta especie carece DHA.

En las diatomeas, *Chaetoceros* y *Skeletonema*, destaca el contenido en EPA (13,7-4,5 %, respectivamente). Pero los contenidos totales por células de las dos especies son muy diferentes, mientras *Chaetoceros* presenta datos de 3,9 pg/cél, *Skeletonema* sólo posee 0,9 pg/cél. Las dos microalgas aportan mayoritariamente el 14:0 y el 16:1(n-7). En los PUFAs también existen diferencias, mientras que, en *Chaetoceros* destaca el 20:5(n-3), en *Skeletonema* lo hace el 18:2(n-6).

La relación (n-3)/(n-6) nos permite agrupar las especies en tres grupos. Por un lado tenemos a las diatomeas (*Chaetoceros* y *Skeletonema*) con unos valores de 2,6 y 1,9 respectivamente; en *Monochrysis* e *Isochrysis* la relación es de 3,0 y 4,1 y por último, en *Tetraselmis* la relación alcanza el valor más alto (7,5).

En consecuencia, las especies de fitoplancton que mayor cantidad de ω 3 aportan por célula son *Tetraselmis*, *Monochrysis* e *Isochrysis*.

1.3.2.- Calidad de las dietas microalgales empleadas en los cultivos larvarios estudiados

Al plantearnos una alimentación adecuada para el cultivo de almeja babosa y de otras especies en el criadero, primero consideramos que las microalgas no deben ser tóxicas, deben tener una talla apropiada para ser ingeridas, una pared celular digerible y así, ser asimilables sus constituyentes bioquímicos. Si una microalga es ingerible y digerible, su valor nutricional dependerá de su composición bioquímica (Webb y Chu, 1983).

Por otro lado, consideramos que en la composición bioquímica hay que tener en cuenta distintos constituyentes, relacionándolos siempre con los conocimientos sobre los requerimientos nutritivos de las distintas especies a cultivar.

En lo que se refiere a las proteínas, las larvas de molusco requieren entre un 30 y un 60 % (en peso seco) de proteína en su dieta microalgal para obtener buenos crecimientos (De Pauw y Persoone, 1988).

Los lípidos de la dieta constituyen las fuentes de energía metabólica y de metabolitos específicos que son esenciales para el crecimiento de los animales. Así Langdon y Waldock (1981) ya indicaban la esencialidad de los ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ especialmente el EPA y DHA en el cultivo de semilla de moluscos bivalvos y por lo tanto, la importancia de su presencia en la dieta.

En la Tabla XI se muestran las dos dietas aplicadas (ya descritas en el capítulo de Material y Métodos). A los cultivos, cuyas puestas fueron en el año 2000 y 2001, se les proporcionó una mezcla de especies distinta a lo largo del desarrollo. Hasta los 13 días se adicionan *Monochrysis* e *Isochrysis* y a partir de aquí, se proporcionó también *Chaetoceros* y *Skeletonema* (Dieta 1).

Pero, los desarrollos de las puestas de los años 2002 y 2003, siempre fueron alimentados con la misma mezcla de *Monochrysis*, *Isochrysis*, *Chaetoceros* y *Tetraselmis* (Dieta 2).

Tabla XI: Mezcla de especies en las dos dietas (D1 y D2) aplicadas a los cuatro cultivos objeto de estudio.

		Hv	Lv D	7 Días	15 Días	22 Días
D1: 2000 y 2001	Especies			Mn, Ig	Mn, Ig, Cht, Sk	
	*Equivalentes			40	50	
D2: 2002 y 2003	Especies			Mn, Ig, Cht, Ts**		
	*Equivalentes		40	60	70	120

*Equivalentes: número de células por μL de volumen del cultivo.

**1 cél de Ts igual a 10 cél de Ig.

Aumentamos las dosis a razón de la demanda de los cultivos y de los crecimientos. Se observa que los desarrollos con buenos resultados requieren más cantidad de fitoplancton (D2: 40-120 equivalentes), pero los de malos crecimientos no aumenta (D1: 40-50 equivalentes).

En la Figura 17 se representa la cantidad de células de fitoplancton aportado por individuo alimentado a lo largo de los cultivos.

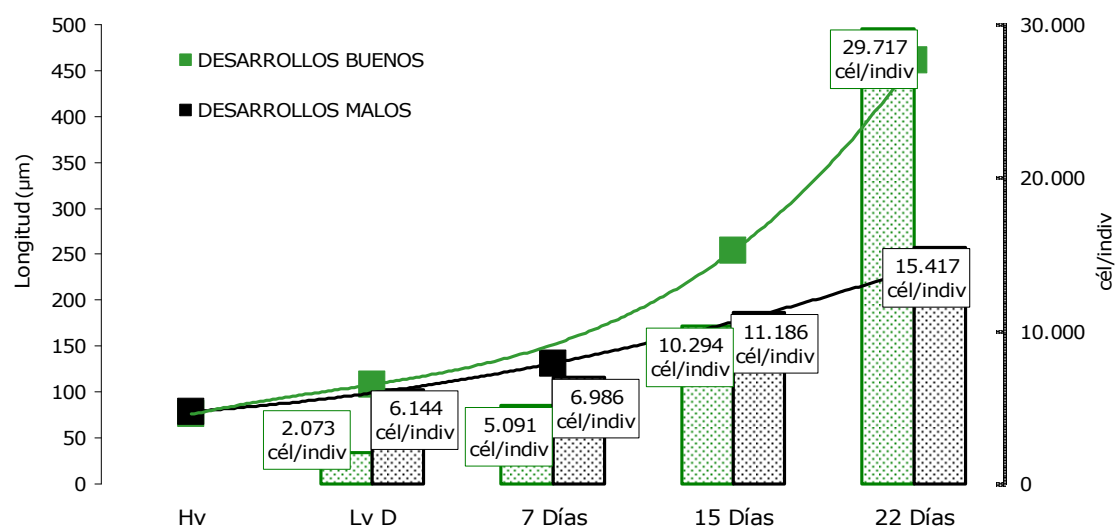


Fig. 17: Curvas de los crecimientos medios de los cuatro cultivos estudiados, (expresados en longitud, en μm de las larvas) en función de las microalgas aportadas por larva alimentada (representados en diagrama de barras, en cél/indiv) con la **Dieta 1** y la **Dieta 2** a lo largo de los desarrollos (desde ovocitos fecundados hasta los 22 días).

Los cultivos con crecimiento rápido tienen un aporte de células, en un primer momento, más bajo que los de crecimiento lento (2.073 cél/larva frente a 6.144), al haber un mayor número de individuos por tanque de cultivo. Sin embargo, al final del desarrollo la cantidad de células es mayor (29.717 frente a 15.417 cél/larva), lo que significa que se proporciona el doble de ración por individuo cultivado en los desarrollos buenos.

1.3.2.1- Composición en proteínas y su relación con el crecimiento observado en los cultivos buenos y malos

La Figura 18 representa la evolución de las proteínas en las dos dietas (D1 y D2) suministradas a los individuos (ng/individuo) de los dos tipos de desarrollos analizados, comparando su aporte con las curvas de crecimiento obtenidas.

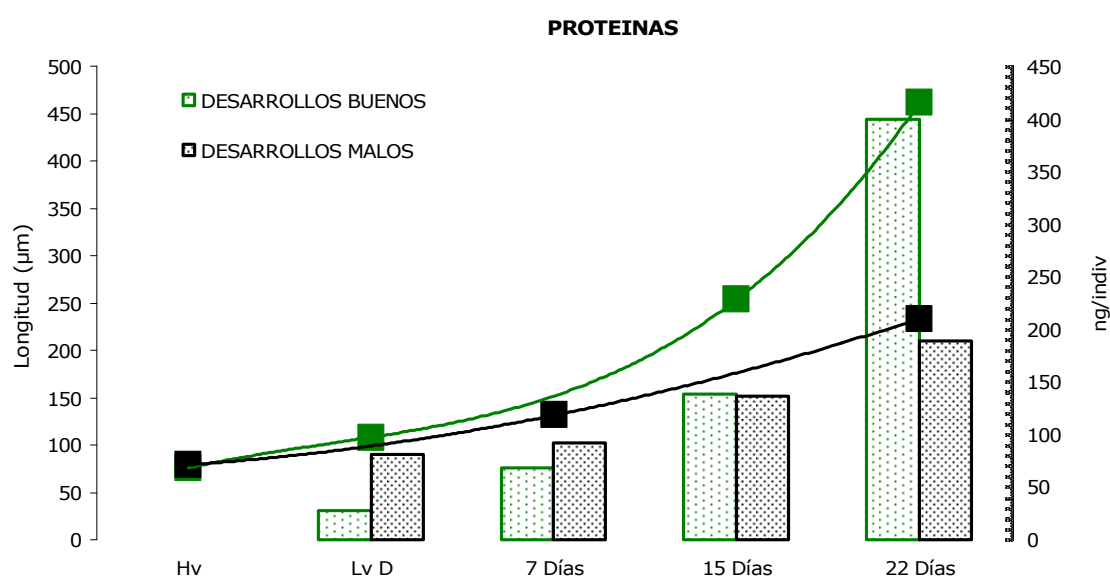


Fig. 18: Evolución de la cantidad de proteínas aportada por larva alimentada (expresado en ng/indiv) en las dos dietas (**D1** y **D2**) suministradas a los dos tipos de desarrollos estudiados y su relación con las curvas de crecimiento observadas (expresado en longitud, en μm).

Al inicio, la cantidad de proteína por individuo alimentado también es mayor en los cultivos de crecimiento lento. Pero, a partir de los 15 días, en los desarrollos buenos las proteínas aumentan (Dieta 2), puesto que se aporta más alimento porque el crecimiento es mayor y los requerimientos

también. Pasamos inicialmente de 27,9 ng/indiv a 399,7 ng/indiv a los 22 días del cultivo.

Para los individuos con un menor crecimiento, el aporte dietético de proteínas (Dieta 1) no aumenta excesivamente puesto que no es necesario el aumento de la cantidad de alimento y, por otro lado, la adición a los 15 días de las otras dos especies de diatomeas, no van a influir de forma definitiva a ese mínimo incremento (inicialmente empezamos con 81,3 ng proteína/indiv, pasando a 188,7 ng/indiv a los 22 días).

La cantidad de proteínas por individuo alimentado es aproximadamente el doble (399,7 frente a 188,7) para los cultivos con crecimientos rápidos, lo cual parece indicar que el contenido en este componente bioquímico está directamente relacionado con la ración suministrada (nº células por individuo) y con el crecimiento observado.

1.3.2.2.- Composición en ácidos grasos y su relación con el crecimiento observado en los cultivos buenos y malos

Al analizar las dietas utilizadas en estos cuatro desarrollos larvarios estudiados, también encontramos diferencias en la composición minoritaria de ácidos grasos debido a la distinta ración aportada, así como a las distintas especies de fitoplancton empleadas.

Los datos porcentuales de los principales ácidos grasos que incorporan las dietas (D1 y D2), así como las familias de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados se muestran en la Tabla XII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XII: Porcentajes de las familias de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y principales ácidos grasos de las dietas utilizadas a lo largo de los desarrollos larvarios (Dieta 1 y Dieta 2). Los datos se expresan en %.

Ác Grasos	%				
	D2: Puestas 2002-2003 DESARROLLOS BUENOS (1,2)		D1: Puestas 2000-2001 DESARROLLOS MALOS (3,4)		
	Hv	Lv D-22 D	Hv	Lv D-6 D	15 D-22 D
14:0		24,3		19,7	26,1
16:0		11,6		10,2	10,8
18:0		1,1		0,4	1,1
16:1(n-7)		17,5		5,9	20,2
18:1(n-9)		6,2		10,5	5,7
18:2(n-6)		4,8		8,8	4,6
18:3(n-3)		6,1		11,0	5,1
18:4(n-3)		8,3		15,5	7,4
20:4(n-6)		1,9		0,0	1,8
20:5(n-3)		7,5		0,6	6,8
22:6(n-3)		6,7		12,6	6,6
SATURADOS		37,0		30,3	38,0
MONOINSAT.		25,4		18,2	27,4
POLIINSAT.		37,6		51,5	34,6
Tot. (n-6)		8,7		11,6	8,5
Tot. (n-3)		28,9		39,9	26,1

Vemos que en la dieta 2, dada a las puestas del 2002 y 2003 con buenos resultados de crecimiento (1, 2), los porcentajes de las familias de ácidos grasos (SAFAs, MUFAs y PUFAs), son siempre constantes: 37,0 %, 25,4 % y 37,6 %, respectivamente.

Pero en las puestas del 2000 y 2001 que dieron malos desarrollos (3, 4), las proporciones de SAFAs, MUFAs y PUFAs de su dieta 1, varían a lo largo de los cultivos. Hasta los 15 días, tenemos valores de 30,3 % de SAFAs, 18,2 % de MUFAs y 51,5 % de PUFAs que aumentan en el caso de los saturados y monoinsaturados (38,0 y 27,4 %) pero disminuyen en los poliinsaturados (34,6 %).

Los resultados muestran una marcada diferencia en las relaciones SAFAs/PUFAs entre las dos dietas analizadas. Así, a los cultivos con buenos desarrollos larvarios se les suministraron equilibradamente ácidos grasos saturados y poliinsaturados (relación 1:1). Sin embargo en el alimento aportado a los cultivos con crecimiento más lento, existe una gran diferencia entre los PUFAs y SAFAs al inicio del cultivo, lo que conlleva a obtener una relación de 1,5:1.

En la Tabla XIII se muestran las cantidades, en ng por individuo alimentado de estos ácidos grasos y de los más importantes en los distintos desarrollos.

Tabla XIII: Composición de las familias de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y principales ácidos grasos de las dietas (D1 y D2) utilizadas a lo largo de los desarrollos larvarios. Los datos se expresan en ng/indiv.

Nº Equivalentes	ng/individuo									
	D2: Puestas 2002-2003 DESARROLLOS BUENOS (1,2)					D1: Puestas 2000-2001 DESARROLLOS MALOS (3,4)				
	Hv	Lv D	7-8 D	15 D	18-22 D	Hv	Lv D	6 D	15 D	18-22 D
	1:1:1:1	1:1:1:1	1:1:1:1	1:1:1:1	1:1:1:1	1:1	1:1	1:1	1:1:1:1	1:1:1:1
Ác Grasos										
14:0		1,370	3,365	6,804	19,642		2,410	2,741	6,409	8,832
16:0		0,653	1,604	3,243	9,363		1,244	1,414	2,659	3,665
18:0		0,061	0,149	0,301	0,869		0,055	0,063	0,267	0,367
16:1(n-7)		0,986	2,421	4,895	14,131		0,722	0,821	4,972	6,853
18:1(n-9)		0,351	0,863	1,745	5,038		1,286	1,462	1,409	1,941
18:2(n-6)		0,269	0,660	1,335	3,853		1,075	1,222	1,136	1,566
18:3(n-3)		0,346	0,851	1,720	4,965		1,342	1,525	1,246	1,717
18:4(n-3)		0,465	1,142	2,309	6,665		1,897	2,157	1,815	2,501
20:4(n-6)		0,106	0,260	0,525	1,515		0,005	0,006	0,438	0,603
20:5(n-3)		0,420	1,033	2,088	6,029		0,077	0,088	1,678	2,312
22:6(n-3)		0,375	0,920	1,861	5,373		1,546	1,758	1,632	2,249
SATURADOS		2,084	5,118	10,348	29,874		3,709	4,217	9,334	12,864
MONOINSAT.		1,432	3,518	7,112	20,532		2,222	2,526	6,740	9,289
POLIINSAT.		2,115	5,195	10,503	30,321		6,296	7,159	8,510	11,728
Tot. (n-6)		0,488	1,199	2,424	6,999		1,422	1,616	2,095	2,887
Tot. (n-3)		1,627	3,996	8,079	23,322		4,874	5,542	6,415	8,840
(n-3)/(n-6)			3,3				3,4		3,1	
TOTAL		5,630	13,830	27,964	80,727		12,226	13,902	24,584	33,881

En la Figura 19 aparecen representados los ng aportados de ácidos grasos $\omega 3$, $\omega 6$ y de 18:2(n-6) por cada individuo alimentado. También se expresa la relación (n-3)/(n-6).

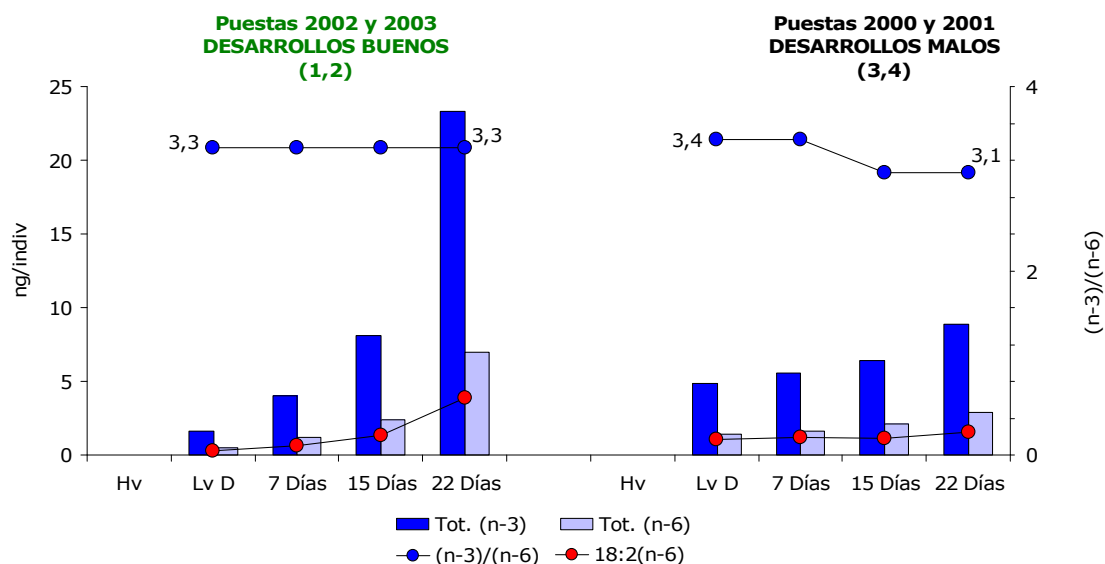


Fig. 19: Representación de los ng/individuo del ácido graso 18:2(n-6) y para el total de ácidos grasos de la serie $\omega 3$ y $\omega 6$ en las dietas (**D1** y **D2**) utilizadas en la alimentación a lo largo de los desarrollos larvarios. Representación de las relaciones $\omega 3/\omega 6$.

Al analizar los datos del total de nanogramos aportados por larvas en las dietas, vemos que en los cultivos calificados como buenos (Dieta 2), se aumenta su cantidad desde el inicio al final del desarrollo larvario 14,4 veces. Sin embargo en la Dieta 1, solo aumenta 2,8 veces, lo que lleva a pensar que, de nuevo la ración (número de células de fitoplancton por individuo), va a estar implicada en esta diferencia puesto que vuelve a ser el doble.

Los datos muestran que en los cultivos con buenos resultados, las variaciones de las cantidades de ng suministrados, tanto de los ácidos grasos de las series $\omega 3$ y $\omega 6$ como del 18:2(n-6), son graduales debido a que se aumenta la ración de alimento (equivalentes) según la demanda del cultivo (crecimientos), pero manteniendo las mismas especies de fitoplancton. Los ng/indiv aportados de $\omega 3$ varían desde 1,6 hasta 23,3; los aportados de $\omega 6$ fueron de 0,5 a 7,0 y los del 18:2(n-6) de 0,3 a 3,9. Esto supone un valor elevado y constante (3,3) de la relación (n-3)/(n-6).

Los desarrollos malos presentan valores, hasta los 15 días de cultivo, de 4,9-6,4 ng/individ de $\omega 3$ frente a 1,4-2,1 ng de $\omega 6$. A partir de este momento, las cantidades aumentan hasta 8,8 de $\omega 3$ y 2,9 de $\omega 6$. El 18:2(n-6) es adicionado a cada individuo en una cantidad casi constante de 1,1-1,6 ng. Esto representa, en la relación (n-3)/(n-6), un valor de 3,4 hasta los 15 días que desciende a 3,1. En este caso, las diferencias encontradas a lo largo de los cultivos, dependen más de las distintas especies incorporadas a la dieta a partir del día 15, al incrementarse poco la ración. Pasamos de 40 a 50 equivalentes en la dieta mala (25 % aumento), mientras que en la dieta buena se pasa de 40 a 70 equivalentes (multiplicamos por más de 1,8 la ración, 75 % de aumento).

Dependiendo de las especies de fitoplancton utilizadas, tenemos una composición en ácidos grasos totales y una relación de $\omega 3/\omega 6$ diferente que va a afectar a los resultados obtenidos en los cultivos estudiados, como veremos posteriormente.

Podría haber una relación positiva entre los cultivos mejores y la relación equilibrada entre SAFAs y PUFAs (1:1). También el aumento en el aporte de 18:2(n-6) puede favorecer al éxito de los cultivos.

Por otra parte, observamos que un exceso de PUFAs (n-3) en la dieta que alteren la relación $\omega 3/\omega 6$, podrían tener un efecto negativo en los cultivos a dos niveles. En un primer momento, su exceso en las reservas vitelinas de los ovocitos, por la alimentación dada a los progenitores, podría inhibir y retardar los procesos lipogénicos responsables de la formación de biomembranas (Clarke, 2001). En un segundo término, por la alimentación suministrada durante el desarrollo larvario.

Sin embargo, lo que más va a alterar la calidad nutricional de las dietas, tanto en su aporte de proteínas como de ácidos grasos, va a ser la ración por individuo de la misma. Así, en los cultivos buenos el número de células de microalgas por individuo alimentado va incrementándose satisfactoriamente a lo largo de los desarrollos, lo que provoca una mejor respuesta del cultivo acortándose el tiempo en alcanzar el estadio de

metamorfosis y observándose una mayor tasa de crecimiento larvario.

2.- EVOLUCIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS CULTIVOS LARVARIOS ESTUDIADOS

2.1.- Datos biométricos y de ácidos grasos en las etapas a analizar

Los datos de la composición en ácidos grasos de almeja babosa, en las fracciones de lípidos polares y neutros, de las distintas etapas de sus desarrollos larvarios (ovocitos, larvas D, larvas veliger y postlarvas) se muestran en el Apéndice.

Asimismo, se exponen los datos de vieira recogidos de la Tesis doctoral de Soudant (1995). En las Tablas que presentamos en el Apéndice no se contabilizan los plasmalógenos y sólo se tienen en cuenta los ácidos grasos mayoritarios, para hacer su comparativa con los ácidos grasos mayoritarios presentes en almejas.

- | | |
|--------------------------|------------------------------|
| ▪ 1.- Almeja babosa | |
| ▪ Ovocito | Apéndice Tablas: XXXVIII-XLI |
| ▪ Larva D | Apéndice Tablas: XLII-XLV |
| ▪ Larva veliger temprana | Apéndice Tablas: XLVI-XLIX |
| ▪ Larva pediveliger | Apéndice Tablas: L-LIII |
| ▪ Postlarva | Apéndice Tablas: LIV-LV |
| ▪ 2.- Vieira | Apéndice Tablas: LVI-LVII |

En la Tabla XIV, se muestran los datos medios biométricos y de ácidos grasos correspondientes a los ovocitos, larvas D, larvas veliger, pediveliger y postlarvas de los cultivos de las dos especies comparadas, para describir las distintas fases (lecitotrófica, mixotrófica y planctotrófica).

Tabla XIV: Datos medios de tamaños (μm), pesos secos (ng), cantidad de ácidos grasos totales (ng) y de lípidos polares y neutros (ng y porcentajes) obtenidos en los ovocitos, larvas D, larvas veliger, larvas pediveliger y postlarvas de los cuatro cultivos de *Venerupis pullastra* analizados y el de *Pecten maximus* (Soudant, 1995), utilizados para comparar cultivos de bivalvos marinos.

		V. pullastra				P. maximus		
		C. Bueno 1	C. Mejor 2	C. Peor 3	C. Malo 4			
Estadio Lecitotrófico	Ovocito	Días	0	0	0	0	0	
		Talla (µm)	76	76	79	72	69-72	
		Peso seco (ng)	28,07	47,62	26,76	5,09		
		ng AGTs LP	0,793	0,841	0,998	0,311	1,142	
		ng AGTs LN	1,983	1,810	2,785	0,353	4,638	
		Tot. AG	2,776	2,651	3,783	0,664	5,780	
		% LN	71,4	68,3	73,6	53,2	78,11	
		% LP	28,6	31,7	26,4	46,8	21,89	
	Larva D	Días	2	2	2	2	2	
		Talla (µm)	115	115	116	109	107	
		Peso seco (ng)	75,14	131,20		55,97		
		ng AGTs LP	0,862	1,714		1,442	1,517	
		ng AGTs LN	2,161	2,099		0,786	3,263	
		Tot. AG	3,023	3,813		2,228	4,780	
		% LN	71,5	55,0		35,3	65,41	
		% LP	28,5	45,0		64,7	34,59	
Estadio Planctotrófico	Larva Veliger temp.	Días	7	8	6		5	9
		Talla (µm)	152	152	148		120	135
		Peso seco (ng)	528,92	999,59	322,15			
		ng AGTs LP	2,946	4,935	1,481		1,143	2,644
		ng AGTs LN	2,531	7,088	2,562		0,603	3,668
		Tot. AG	5,477	12,023	4,043		1,746	6,312
		% LN	46,2	59,0	63,4		29,72	54,82
		% LP	53,8	41,0	36,6		70,28	45,18
	Larva Pediveliger	Días	15	15	22	18	19	
		Talla (µm)	238	254	234	230	195	
		Peso seco (ng)	1630	3020	2290	2070		
		ng AGTs LP	8,333	20,641	21,287	19,175	4,932	
		ng AGTs LN	5,555	14,385	66,658	10,633	15,648	
		Tot. AG	13,888	35,026	87,945	29,808	20,580	
		% LN	40,0	41,1	75,8	35,7	72,69	
		% LP	60,0	58,9	24,2	64,3	27,31	
	Postlarva	Días	28	22			23	
		Talla (µm)	534	461			215	
		Peso seco (ng)	9750	10080				
		ng AGTs LP	15,631	50,935			5,426	
		ng AGTs LN	13,141	23,293			16,102	
		Tot. AG	28,772	74,228			21,528	
		% LN	45,7	31,4			72,69	
		% LP	54,3	68,6			27,31	

2.2.- Estadío de vida lecitotrófica. Paso de ovocitos fecundados a larva D

La calidad del ovocito va a ser determinante en el paso a larva D, al ser un período de vida lecitotrófica.

Nuestros resultados referidos a los ovocitos fecundados de almeja babosa, *Venerupis pullastra*, y concretamente a su fracción de lípidos neutros o de reserva, muestran una relación positiva entre un ovocito que origina un buen desarrollo larvario y su contenido en 18:2(n-6).

Así el cultivo mejor y el cultivo bueno, tienen un contenido en ácido linoleico de 0,204 y 0,218 ng/ovocito, respectivamente (Tabla XL del Apéndice), constituyendo aproximadamente el 11 % del total de ácidos grasos presentes en esta fracción.

Paralelamente, observamos una relación negativa en el caso inverso. El cultivo peor y el cultivo malo, tienen 0,043 y 0,016 ng/ovocito, respectivamente (Tabla XLI del Apéndice) representando, en este caso, el 1,5 y el 4,5 % de AGTs en ambos cultivos.

Para el 18:3(n-3), nuestros resultados no evidencian que su almacenamiento en lípidos de reserva ovocitarios se traduzca en una mejora en el desarrollo larvario (ver Tablas XL y XLI del Apéndice). Su contenido es de tan sólo 0,038 ng y 0,033 ng/ovocito en los cultivos buenos (1,8 y 1,9 % de los AGTs en lípidos neutros), mientras que en el cultivo peor su contenido es de 0,052 ng/ovocito (1,9 % de los AGTs) y de sólo 0,004 ng/ovocito en el cultivo malo (1,0 %).

Esto puede ser debido a que en el medio marino las fuentes alimenticias son más ricas en ácidos grasos ω 3 que en ácidos grasos ω 6 (Tabla X) siendo el contenido de estos últimos en lípidos de reserva, más influenciado por posibles déficits nutricionales.

La relación $\omega 3/\omega 6$, en lípidos de reserva de los cultivos bueno y mejor, es de 1,6. Se almacenan entre 0,505 y 0,525 ng/ovocito de (n-3) totales y entre 0,324 y 0,323 ng/ovocito de (n-6).

En el cultivo malo la relación sube a 3,3 almacenándose en este caso menor cantidad de ambas series [0,104 ng/ovocito para (n-3) por tan sólo 0,032 ng/ovocito en (n-6)]. Aquí, la limitación en el almacenamiento de ácidos grasos $\omega 6$, se ve compensada parcialmente por una limitación similar en el almacenamiento de los $\omega 3$.

En el cultivo peor la relación sube hasta 6,6 (4 veces más que en los cultivos buenos) debido a que disminuye a la mitad aproximadamente, la cantidad de totales (n-6) en los cultivos buenos (0,164 ng/ovocito) y se duplica la cantidad de totales (n-3) en los cultivos buenos (1,080 ng/ovocito). Aquí se produce un doble efecto, el primero debido a un almacenamiento bajo en ácidos grasos $\omega 6$ [fundamentalmente el 18:2(n-6)] y el otro, el almacenamiento en lípidos de reserva de ácidos grasos $\omega 3$ (principalmente de EPA y DHA) debido a un exceso en la dieta. En la evolución de éste cultivo larvario parece influir, en mayor grado, el segundo efecto.

La bibliografía indica que un exceso en la dieta de PUFAs y, particularmente de la serie $\omega 3$, provoca una regulación de la expresión de genes implicados en procesos lipolíticos (activando enzimas implicadas en la β -oxidación), así como una inhibición en la transcripción de genes implicados en procesos lipogénicos (Clarke, 2001).

Dietas ricas en PUFAs (n-3) suprimen la expresión de enzimas tales como la ACC (acetil-CoA carboxilasa), la FAS (ácido graso sintetasa) y la SCD (estearoil-CoA desaturasa), monoinsaturados de las series $\omega 7$ [16:1(n-7)] y $\omega 9$ [18:1(n-9)] (Jump y Clarke, 1999; Duplus y col., 2000; Sessler y Ntambi, 1998), también afectan a la expresión de las $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ ($\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas) implicadas en la biosíntesis de PUFAs de las series $\omega 3$ y $\omega 6$ (Cho y col., 1999a; Cho y col., 1999b).

Todos estos efectos inciden negativamente en los procesos lipogénicos, en la formación de biomembranas y por tanto, en el crecimiento larvario, pudiendo ser responsables del mal comportamiento de los ovocitos del cultivo 3 que acumulan muchos $\omega 3$ en sus reservas lipídicas.

Comparando los datos obtenidos para ovocitos y larvas de almeja babosa (*V. pullastra*) con los de vieira procedentes de la Tesis Doctoral presentada por Philippe Soudant (1995), podemos ver similitudes o diferencias de estrategias durante las distintas etapas del desarrollo larvario en ambas especies.

Nuestros datos sobre *Venerupis pullastra* proceden de los resultados obtenidos en tres cultivos de almeja: cultivo mejor y cultivo bueno y cultivo malo.

En la Tabla XV se muestra la evolución de los ácidos grasos mayoritarios en la fracción de lípidos polares (estructurales) y su incremento total obtenido en el período de ovocito fecundado a larva D en ambas especies, así como de larva D a larva de 5 días para el caso de *Pecten maximus*.

Tabla XV: Evolución de los ácidos grasos en lípidos de membrana (LP) en ausencia de alimento exógeno: En la almeja, se muestra la evolución de 3 cultivos desde ovocito a larva D. En vieira la evolución es desde ovocito a larva D y de larva D a larva de 5 días (fase mixotrófica). Los datos se expresan en ng ó pg/48 horas en la transformación de ovocito a larva D para las dos especies y en ng ó pg/día en la etapa mixotrófica de vieira.

	<i>Venerupis pullastra</i>			<i>Pecten maximus</i>	
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Cultivo 4 Malo	Ovocito	Larva D Lv 5 Días
	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	(F. Mixotrófica)
ng AGTs LP	0,841 Ovocito	0,793 Ovocito	0,311 Ovocito	1,142 Ovocito	1,517 Lv D
ng AGTs LP	1,714 Lv D	0,862 Lv D	1,442 Lv D	1,517 Lv D	1,143 Lv 5 Días
Δ Total	873 pg	69 pg	1.131 pg	375 pg	-124 pg
Ganancia AGTs	894 pg	142 pg	1131 pg	375 pg	6 pg
Pérdida AGTs	-21 pg	-73 pg	---	---	-130 pg
Δ 16:0	200 pg (22,4 %)	16 pg (9,6 %)	315 pg (27,9 %)	50 pg (13,3 %)	-17 pg (-13,1 %)
Δ DHA	157 pg (17,6 %)	20 pg (12,0 %)	138 pg (12,2 %)	103 pg (27,5 %)	-32 pg (-24,6 %)
Δ 18:0	98 pg (11,0 %)	6 pg (3,6 %)	229 pg (20,2 %)	37 pg (9,9 %)	-8 pg (-6,2 %)
Δ 18:1(n-9)	80 pg (8,9 %)	22 pg (13,2 %)	35 pg (3,1 %)	13 pg (3,5 %)	---
Δ 20:2(n-6)	55 pg (6,2 %)	15 pg (10,6 %)	24 pg (2,1 %)	4 pg (1,1 %)	-2 (-1,5 %)
Σ 4 AG (%)	59,9 %	38,4 %	63,4 %	54,2 %	-43,9 %
Δ EPA	-21 pg (-2,3 %)	-45 pg (-26,9 %)	75 pg (6,6 %)	26 pg (6,9 %)	-40 pg (-30,8 %)

Nuestros resultados muestran un aumento de ácidos grasos en lípidos polares (lípidos de membrana o estructurales), confirmando los procesos biosintéticos que permiten transformar el ovocito en larva D (*V. pullastra*).

En la vieira también se observa un aumento en AGTs en la fracción de lípidos polares, en el paso de ovocito a larva D, lo que corrobora los procesos biosintéticos y de reestructuración de membranas.

La evolución de los ácidos grasos mayoritarios en la fracción de lípidos neutros (reservas) así como el incremento total obtenido en el mismo período en ambas especies se expone en la Tabla XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XVI: Evolución de los ácidos grasos en lípidos de reserva (LN) en ausencia de alimento exógeno: En la almeja, se muestra la evolución de 3 cultivos desde ovocito a larva D. En vieira la evolución es desde ovocito a larva D y de larva D a larva de 5 días (fase mixotrófica). Los datos se expresan en ng ó pg/48 horas en la transformación de ovocito a larva D para las dos especies y en ng ó pg/día en la etapa mixotrófica de vieira.

	<i>Venerupis pullastra</i>			<i>Pecten maximus</i>	
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Cultivo 4 Malo	Ovocito	Larva D Lv 5 Días
	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	Ovocito Larva D	(F. Mixotrófica)
ng AGTs LN	1,810	1,983	0,353	4,638	3,263
	Ovocito	Ovocito	Ovocito	Ovocito	Lv D
ng AGTs LN	2,099	2,061	0,786	3,263	0,603
	Lv D	Lv D	Lv D	Lv D	Lv 5 Días
Δ Total	289 pg	78 pg	433 pg	-1.375 pg	-887 pg
Ganancia AGTs	437 pg	191 pg	436 pg	11 pg	1 pg
Pérdida AGTs	-148 pg	-113 pg	-3 pg	-1.386 pg	-888 pg
Δ 16:0	141 pg (32,3 %)	76 pg (28,3 %)	92 pg (21,3 %)	-269 pg (-19,4 %)	-190 pg (-21,4 %)
Δ 22:5(n-3)	122 pg (27,9 %)	7 pg (2,6 %)	60 pg (13,9 %)		
Δ 16:1(n-7)				-152 pg (-11,0 %)	-95 pg (-10,7 %)
Δ 18:0	94 pg (21,5 %)	15 pg (5,6 %)	54 pg (12,5 %)	-37 pg (-2,7 %)	
Δ 14:0					-60 pg (-6,8 %)
Σ 3 AG (%)	81,7 %	36,5 %	47,7 %	-33,1 %	-38,9 %
Δ EPA	-90 pg (-20,6 %)	-23 pg (-8,6 %)	3 pg (0,7 %)	-340 pg (-24,5 %)	-159 pg (-17,9 %)
Δ 18:2(n-6)	-27 pg (-6,2 %)	-18 pg (-9,4 %)	39 pg (9,0 %)	-56 pg (-4,0 %)	-31 pg (-3,5 %)
Δ DHA	-11 pg (-2,5 %)	7 pg (2,6 %)	6 pg (1,4 %)	-69 pg (-5,0 %)	-73 pg (-8,2 %)

Sin embargo, la estrategia que siguen para completar este período parece ser distinta tanto en la vieira como en la almeja babosa. Así en la vieira, claramente se lleva a cabo a partir de los ácidos grasos presentes en los lípidos neutros o de reserva (consumo de 1.386 pg/larva D). En cambio, en la almeja babosa los resultados muestran un incremento neto en los ácidos grasos totales en la fracción de lípidos de reserva (acúmulo entre 78 y 433 pg/larva D, según el cultivo).

2.2.1.- Estrategia en almeja babosa (*Venerupis pullastra*)

Los resultados muestran que para realizar correctamente el paso de ovocito a larva D, *V. pullastra* requiere un mayor incremento de los siguientes ácidos grasos en lípidos polares:

- Ácido palmítico, 16:0
- Ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3)
- Ácido esteárico, 18:0 y
- Ácido oleico, 18:1(n-9)

Estos 4 ácidos grasos representan entre el 59,9 % y el 63,4 % de los AGTs que se incorporan en las membranas en el paso de ovocito a larva D, cuando en el proceso hay una ganancia clara en ácidos grasos de la fracción de lípidos de membrana (873 pg/48 horas en el cultivo mejor y 1.131 pg/48 horas cultivo malo). Su porcentaje disminuye al 38,4 %, cuando en el proceso hay un incremento pequeño en los ácidos grasos de dicha fracción (94 pg/48 horas en el cultivo bueno).

De estos 4 ácidos grasos, tres se encuentran en el eje principal que conecta las rutas biosintéticas de las cuatro series mayoritarias en los lípidos de membrana: ω 3, ω 6, ω 9 y ω 7 (Figura 20).

Un incremento en estos tres ácidos grasos podría estar relacionado con la fluidez de las rutas biosintéticas que implican la transformación de membranas de ovocito a larva D.

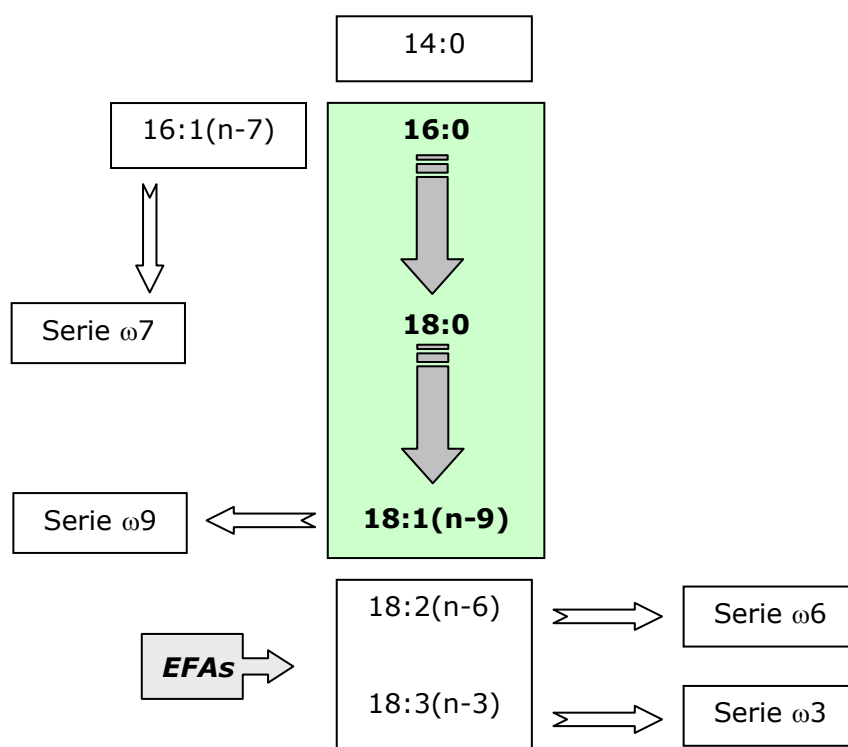


Fig. 20: Diagrama de los ácidos grasos precursores de las series más importantes en membranas de larvas de bivalvos marinos. En negrita tres de los cuatro ácidos grasos que más aumentan en el paso de ovocito fecundado a larva D.

Con respecto al otro ácido graso que más aumenta (157 pg/48 horas), el DHA, parece tener un papel importante en el cambio de ovocito a larva D, estando relacionada su evolución positiva con la disminución del EPA (90 pg/48 horas) en lípidos neutros del cultivo mejor para la almeja babosa.

Es probable que dentro de los lípidos de membrana en este período sean importantes el 16:0 en posición sn-1 y el 22:6(n-3) en posición sn-2 del glicerol, constituyendo la base para la construcción de los fosfolípidos de membrana más representativos en la estructura de una larva D.

El balance global, en la almeja babosa y para el paso de ovocito fecundado a larva D, es de acumular AGTs en lípidos de reserva, indistintamente si el desarrollo larvario posterior va a evolucionar tanto positiva como negativamente.

2.2.1.1.- Capacidad de biosíntesis de ácidos grasos en la fase de vida lecitotrófica

Los resultados en las Tablas XV y XVI para *V. pullastra* en los distintos cultivos, muestran que en las reservas vitelinas y en ausencia del aporte de nutrientes vía alimentación, se incrementa el contenido de 16:0 y 18:0; ácidos grasos necesarios en la construcción de membranas y que aparecen con un alto contenido en lípidos polares.

El incremento neto observado en los AGTs de la fracción de lípidos neutros, es soportado principalmente por el ácido palmítico (16:0), que juega un claro papel estructural, aumentando su contenido en la fracción de lípidos polares, conforme más aumenta su contenido en la fracción de lípidos neutros.

Sin embargo en los PUFAs, y en la fracción de lípidos neutros se observa un descenso en los niveles de EFAs 18:2(n-6), principalmente y de HUFAs (EPA y, en menor medida, DHA) en el cultivo mejor.

Por lo tanto, los datos parecen indicar que en esta especie, las reservas en lípidos neutros no soportan exclusivamente el paso a larva D, estando activada la ruta de biosíntesis de ácidos grasos a este nivel, produciéndose ácido palmítico a partir de precursores sencillos, tipo acetil-CoA procedentes del catabolismo de otras macromoléculas presentes en el vitelo (p. ej. hidratos de carbono-glucosa-acetil-CoA o proteínas-aminoácidos-acetil-CoA).

Según referencias mencionadas en la Introducción, existe la posibilidad de inhibir la lipogénesis "*de novo*", siendo las concentraciones de la ácido graso sintetasa (con papel clave en este proceso) muy sensible a parámetros nutricionales y hormonales en tejidos lipogénicos, tales como el hígado y tejido adiposo en mamíferos (Wakil y col., 1983; Hillgartner y col., 1995; Lakshmanan y col., 1972).

Si tal como parece, existe una actividad lipogénica en las reservas vitelinas del ovocito fecundado, esta puede verse afectada tanto por factores hormonales como nutricionales y en este caso, verse alterada por dietas que provoquen un excesivo acúmulo de PUFA's (n-3).

Esta hipótesis sería aplicable al cultivo peor donde los ovocitos presentan una relación (n-3)/(n-6) muy alta (6,6 frente a 1,6 en cultivos 1 y 2), duplicando el contenido en PUFA's (n-3) de los cultivos buenos 1 y 2 (1,080 frente 0,505 y 0,525 ng/ovocito, respectivamente).

Esto repercutiría en la actividad lipogénica, provocando una inhibición en la formación de biomembranas y lógicamente, en la tasa de crecimiento del cultivo 3.

2.2.1.2.- Capacidad de bioconversión de ácidos grasos en la fase de vida lecitotrófica

En la evolución de ácidos grasos mayoritarios en ésta fase, tanto en la fracción de lípidos neutros como polares, observamos el aumento en dos ácidos grasos, los cuales sólo pueden proceder de las reservas acumuladas:

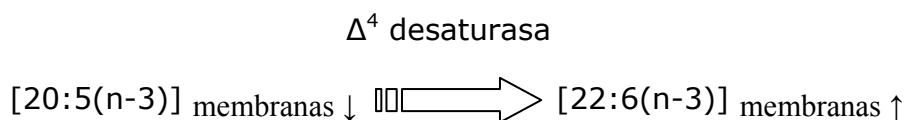
- 1.-Aumento del **22:5(n-3)** en LN
- 2.-Aumento del **20:2(n-6)** en LP

1.-"Se incrementa en los lípidos neutros el contenido en **22:5(n-3)**"

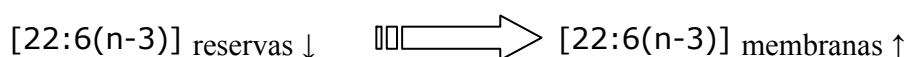
La explicación se puede encontrar contestando a la pregunta: ¿De dónde procede el 22:6(n-3) que se incrementa en los lípidos polares (estructurales) en este período, denominado lecitotrófico o de no alimentación exógena, en el que se recurre a las reservas vitelinas?

La respuesta tiene tres posibles contestaciones:

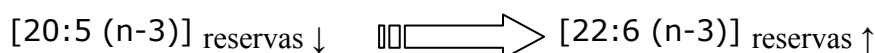
- Bien a partir de procesos de biotransformación dentro de la fracción de lípidos de membrana que llevan implícitos la desaparición de su posible precursor, p. ej.:



- O bien a partir de la desaparición en los lípidos de reserva del ácido graso demandado (DHA) y su trasvase a membranas, p. ej.:



- O de un posible precursor del mismo, el EPA:



La transformación de EPA en DHA parece no ocurrir de forma directa por la actuación de la supuesta delta 4-desaturasa y en nuestros datos no existe un descenso acusado en membranas de EPA para soportar el aumento observado en el DHA de membranas.

Por otro lado, el contenido en DHA en lípidos neutros no es suficiente para soportar el incremento del mismo en lípidos polares.

Sin embargo existen evidencias en hígado de rata del uso de la denominada vía de Sprecher, propuesta por Voss y col., (1991) y que conllevaría la biotransformación de EPA en DHA. La evidencia de su funcionamiento en invertebrados marinos debería estar condicionada a la presencia de alguno de los metabolitos de la ruta, en condiciones de no alimentación características en el paso de ovocito a larva D.

Los resultados obtenidos en almeja babosa del cultivo mejor, muestran un incremento en el contenido de 22:5(n-3) en lípidos de reserva, también observado en el cultivo malo y, en menor medida, en el cultivo bueno, metabolito intermediario en la vía de Sprecher.

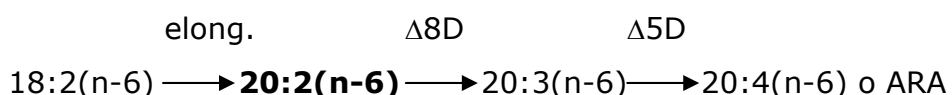
Esto unido a la disminución del EPA en lípidos de reserva y al importante incremento de DHA en lípidos de membrana (sin un aporte externo), parece sugerir el funcionamiento de la vía Sprecher (ver el capítulo de Introducción) en las reversas vitelinas durante la embriogénesis y posterior paso a larva D. Este DHA formado por β -oxidación peroxisomal, junto con el que ya existe en esta fracción de lípidos neutros, se emplearía como sillar estructural en la biosíntesis de los fosfolípidos de membrana.

2.-"Se incrementa el contenido de **20:2(n-6)** en lípidos polares, no habiendo el correspondiente gasto de este ácido graso en lípidos de reserva"

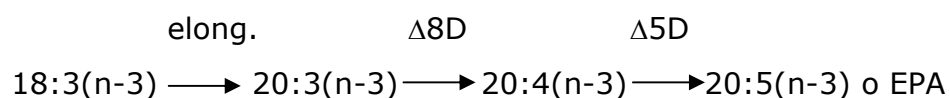
En este caso la pregunta a plantear es: ¿Adónde va el 18:2(n-6) acumulado en los lípidos neutros y que se consume en este período, denominado lecitotrófico o de no alimentación exógena, tanto en el cultivo mejor de *V. pullastra* como en *P. maximus*?

En *V. pullastra*, sí se biosintetizan membranas en el paso de huevo a larva D. El precursor de la serie $\omega 6$, que sólo puede ser obtenido de las reservas, dará lugar a sus posibles productos.

Además de las rutas $\omega 6\Delta^6$ y $\omega 3\Delta^6$ vistas en la Introducción, también es posible biosintetizar 20:2(n-6), mediante la **ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$** :



Asimismo, existe una ruta equivalente que partiendo del otro EFA, 18:3(n-3) da lugar al EPA, **ruta metabólica $\omega 3\Delta^8$** :



La funcionalidad de ambas rutas requiere en primer lugar, la actividad del gen C18- Δ^9 ácido graso poliinsaturado con una específica actividad Δ^9 elongasa (elonga del $\Delta 9$ hacia el grupo carboxilo), reconocido en *Isochrysis galbana* (Qi y col., 2002).

En segundo término es necesaria la actividad Δ^8 desaturasa, ya descrita en el alga *Euglena gracilis* (Watts y Browse, 1999), capaz de generar un doble enlace en la posición Δ^8 , dando lugar al 20:3(n-6) en la serie $\omega 6$ y al 20:4(n-3) en la serie $\omega 3$.

Por último se requiere una actividad Δ^5 desaturasa que origina ARA en la serie $\omega 6$ y EPA en la serie $\omega 3$, actividad descrita en diferentes organismos invertebrados como el gusano *Caenorhabditis elegans* (Watts y Browse, 1999); en vertebrados, caso de humanos, (Cho y col., 1999a; Leonard y col., 2000) y en el reino vegetal en la planta *Mortierella alpina*, (Michaelson y col., 1998).

La presencia de actividades elongasas y/o desaturasas en la almeja babosa (y por lo tanto la capacidad de bioconversión de los EFAs) podría rastrearse por el aumento sustancial de un metabolito de alguna de las rutas en la fracción de lípidos de membrana, siempre que ese aumento no sea consecuencia de un transvase del mismo procedente de las reservas neutras en las larvas.

Nuestros resultados muestran un aumento apreciable del 20:2(n-6) en lípidos polares (estructuras) en el paso de ovocito fecundado a larva D en la almeja babosa.

Este aumento no está ligado a un posible transvase del 20:2(n-6) presente en lípidos neutros (reservas), ni al aporte externo de alimento al ser un período de no alimentación exógena.

Los datos de la Tabla XVII nos indican la posible funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ en *V. pullastra*, obteniéndose el producto final de la ruta (ácido araquidónico) bien a partir del 20:2(n-6), procedente de la elongación del ácido linoléico o bien, a partir de las reservas del mismo en lípidos neutros.

Tabla XVII: Porcentaje de elongación en el paso de 18:2(n-6) a 20:2(n-6) correspondiente a la hipotética funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$, para las dos especies comparadas de bivalvos en el paso de ovocito a Larva D.

Ruta $\omega 6\Delta^8$ LÍPIDOS MEMBRANA	<i>V. pullastra</i>			<i>P. maximus</i>
	2	1	4	
Δ 18:2(n-6)	34 pg	12 pg	15 pg	7 pg
Δ 20:2(n-6)	55 pg	15 pg	24 pg	4 pg
% de elongación*	61,8 %	55,6 %	61,5 %	36,4 %

* % elongación = (producto / (producto + sustrato) x 100).

El 20:2(n-6) en lípidos polares podría ser un buen marcador en el paso de ovocito fecundado a larva D en la almeja babosa, observándose una relación estrecha entre su incremento y el éxito del proceso.

En *P. maximus* la funcionalidad de la ruta es mucho menor incorporando ácido araquidónico en membranas a partir principalmente, del acumulado en lípidos neutros.

Por otro lado, los datos de la Tabla XVIII nos indican la no presencia de metabolitos implicados en la ruta metabólica $\omega 3\Delta^8$, tanto en *V. pullastra* como en *P. maximus*.

Tabla XVIII: Porcentaje de elongación en el paso de 18:3(n-3) a 20:3(n-3) correspondiente a la hipotética funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 3\Delta^8$, para las dos especies comparadas de bivalvos en el paso de ovocito a Larva D.

Ruta $\omega 3\Delta^8$ LÍPIDOS MEMBRANA	V. pullastra			P. maximus
	2	1	4	
Δ 18:3(n-3)	20 pg	-18 pg	23 pg	5 pg ¹
Δ 20:3(n-3)	---	---	---	---
% de elongación*	---	---	---	---

* % elongación = (producto / (producto + sustrato) x 100).

Esto estaría relacionado con la abundancia de ácidos grasos de la serie $\omega 3$ aportados en la alimentación y por lo tanto, acumulados en sus reservas neutras, y la nula necesidad de biotransformarlos a partir de su precursor 18:3(n-3).

La consecuencia lógica que se extrae de esta discusión es:

1.- La capacidad de biosíntesis de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) y monoinsaturados [18:1(n-9)] en *V. pullastra*, al incrementar su contenido, tanto en lípidos neutros como polares, en un período de no alimentación

2.- La capacidad de biotransformación de ácidos grasos de cadena larga y poliinsaturados que presenta *V. pullastra*, en el paso de ovocito fecundado a larva D al incrementar ciertos ácidos grasos [22:5(n-3) y 20:2(n-6)] en sus lípidos neutros y polares, respectivamente. Este aumento no está relacionado con el aporte externo de los mismos vía alimentación o con su posible transvase de los compartimentos de reservas a estructuras o viceversa

2.2.2.- Estrategia en vieira (*Pecten maximus*)

P. maximus requiere incrementar los mismos ácidos grasos mayoritarios en membrana que *V. pullastra*, en el paso de ovocito fecundado a larva D (Tabla XV):

- Ácido palmítico, 16:0
- Ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3)
- Ácido esteárico, 18:0
- Ácido oleico, 18:1(n-9) y en menor medida el
- Ácido eicosapentaenoico, 20:5(n-3)

Los cinco ácidos grasos representan el 54,2 % del incremento de AGTs en lípidos de membrana, con un aumento de 375 pg/48 horas.

Esto nos indica la similitud de sillares estructurales implicados en la transformación y reestructuración de los lípidos de membrana en el paso de ovocito fecundado a larva D para estas dos especies de bivalvos.

El aumento de DHA en los lípidos estructurales (Tabla XV) se relaciona, aunque no de forma cuantitativa, con el acusado descenso de EPA en los lípidos de reserva. Esto parece confirmar un papel energético primordial al EPA y un papel secundario como fuente de HUFAs en la construcción de lípidos de membrana en *P. maximus*.

Las necesidades de 16:0, 18:0 y en menor grado de 18:1(n-9) en lípidos polares, son satisfechas por las reservas de los mismos acumuladas en los lípidos neutros de ovocitos.

Los resultados en vieira y para ésta fase, muestran un claro consumo de las reservas en lípidos neutros, con una pérdida de 1.375 pg de AGTs en dicha fracción lipídica, estrategia completamente diferente a la observada en *V. pullastra*, donde se observa una actividad lipogénica, acumulándose ácidos grasos del tipo SAFAs y en menor medida MUFAs, consumiéndose sólo ciertos ácidos grasos poliinsaturados.

Los ácidos grasos más implicados en este descenso en las reservas neutras de ovocitos a larvas D de vieira, son:

- El EPA con un descenso de 340 pg
- El 16:0 con una pérdida de 269 pg y
- El 16:1(n-7) con descenso menor (152 pg)

La falta de actividad biosintética de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en las reservas neutras de vieira durante su paso de ovocito a larva D, observada por la disminución constante de los mismos, mayoritariamente el 16:0, parece sugerir una nueva estrategia en la superación de este estadio.

La energía para los procesos biosintéticos en la formación de las biomembranas de la larva D parece recaer fundamentalmente sobre los ácidos grasos que, a mayor ritmo, desaparecen de las reservas neutras: 16:0, EPA y 16:1(n-7).

El 16:0 y el EPA parecen tener dos papeles: uno energético, consumiéndose ambos para obtener energía necesaria en la construcción de biomembranas y otro, aportando estas moléculas como sillares estructurales para la síntesis de los lípidos de membrana.

Por otro lado, la ausencia del 22:5(n-3) nos informa del nulo o bajo funcionamiento de la vía de Sprecher en el paso de ovocito a larva D en vieira, pudiendo estar implicada otra ruta como sería la biotransformación EPA en DHA mediante ciclo elongación-desaturación en donde intervienen la $\Delta 4D$.

El DHA almacenado en los lípidos de reserva tendría el papel principal de soportar el incremento de DHA en membranas, mientras que el EPA tendría dos papeles, uno energético (mayoritario), y otro secundario, satisfaciendo las necesidades de EPA en membranas y en menor medida de DHA (Tablas XV y XVI).

El consumo preferencial del 20:5(n-3) en los lípidos neutros y de forma menos acusada, en los polares en el paso de ovocito fecundado a larva D, han sido ligados a un papel energético de este ácido graso en larvas en ayuno de *Pecten maximus* (Delaunay, 1992) o durante la embriogénesis de *Crassadoma gigantea* (Whyte y col., 1990b).

Este consumo podría corresponderse bien a una eliminación de un exceso de este ácido graso, suministrado abundantemente por las diatomeas en el medio natural, o bien a una necesidad fisiológica asociada a la etapa de embriogénesis (Soudant, 1995).

Nosotros nos inclinamos más a presuponer un papel ligado claramente a la transformación de ovocito en larva D, que a su posible eliminación por exceso del mismo en el medio natural. Así otras especies de bivalvos que pasan por el estadio de larva D, muestran un comportamiento similar consistente en perder EPA a costa de mantener el DHA.

La menor o mayor pérdida de EPA tendrá que ver con su uso como molécula sólo estructural o energética.

El ácido palmítico parece tener un papel energético para soportar los cambios fisiológicos de ovocito fecundado a larva D, así como el de servir de sillar estructural en los lípidos de membrana al aumentar su contenido en lípidos polares.

El ácido palmitoléico jugaría más bien un papel energético al no ser cuantitativamente importante su presencia en lípidos polares.

Resumiendo y comparando estrategias en la transformación de ovocito a larva D, podemos indicar que:

- 1.- En *P. maximus* tanto los sillares estructurales, como los combustibles para la transformación de las membranas del ovocito fecundado a larva D, proceden mayoritariamente de sus reservas neutras

2.- En *V. pullastra*, parecen gastarse únicamente PUFAs de las reservas neutras, habiendo un incremento de SAFAs y MUFAs en dichas reservas, lo cual parece sugerir una biosíntesis “*de novo*” de ácidos grasos a partir de precursores no lipídicos

3.- En todo caso, los ácidos grasos más implicados en el proceso de transformación en los lípidos de membrana ovocitarios a sus equivalente en larva D, son los mismos para ambas especies: 16:0, DHA, 18:0 y 18:1(n-9), siendo en un menor porcentaje específico el incremento de 20:2(n-6) en almeja y de EPA, en vieira. Esto induce a pensar en la similitud estructural, en términos lipídicos, para las larvas D de las dos especies

2.3.- Estadío de vida mixotrófica

En vieira, observamos un período de reestructuración tisular que va más allá de la formación de la larva D (Tablas XV y XVI). Existe claramente un gasto energético en lípidos de reserva hasta el día 5, siendo el 16:0 y el EPA los que más desaparecen (190 pg/día el ácido palmítico y 159 pg/día el ácido eicosapentaenoico).

Aquí el EPA tendría un papel eminentemente energético al no observarse un incremento del mismo, o de sus posibles productos de metabolización (DHA) en lípidos de membrana. Esto está en consonancia con la clara pérdida de AGTs en los lípidos de reserva para este período, sin su correspondiente transvase a AGTs en membranas.

Presumiblemente estas reservas lipídicas neutras son empleadas como fuente de aporte energético para los procesos biosintéticos y de reestructuración tisular, pudiendo ser más complejo en el caso de la vieira que en la almeja babosa, lo que se traduce en la aparición de este estado intermedio entre la formación de la larva D y la larva de 5 días.

Así entre larva D y larva de 5 días no se acumulan reservas en lípidos neutros y si las larvas de vieira se encuentran en una etapa mixo-

trófica, todo lo que ingieran o tengan almacenado, lo emplearán o bien como sillar estructural en procesos biosintéticos, o como combustible para producción de energía química necesaria en los procesos biosintéticos.

Es a partir de la larva de 5 días cuando se comienza a acumular ácidos grasos en sus reservas lipídicas (almacenamiento), así como a incrementar sus AGTs en lípidos de membrana (crecimiento), lo que evidencia una vida planctotrófica clara a partir de dicho día.

En *Venerupis pullastra*, y en todos los desarrollos larvarios buenos, se observa un acúmulo de AGTs en sus lípidos neutros a partir de la larva D. Esto parece indicar que en ésta especie, no existe un período mixotrófico claro. Es lo mismo que decir que la almeja babosa pasa de un metabolismo lecitotrófico a planctotrófico sin una etapa intermedia mixotrófica.

Esto produce una ralentización en el crecimiento del cultivo larvario de la vieira si lo comparamos con el de la almeja (Tabla XIV). Así entre los días 6 y 8 para los cultivos de almeja babosa estudiados, nos encontramos larvas con un tamaño entre 148 y 152 μm , mientras que entre los días 5 y 9 del cultivo de la vieira, los tamaños larvarios están comprendidos entre 120 y 135 μm , partiendo ambas especies de ovocitos de similar tamaño (70 μm).

2.4.- Estadío de vida planctotrófica

2.4.1- Comportamiento de la larva veliger temprana

Comparando nuestros datos durante el período de vida planctotrófico de las larvas de almeja babosa, con los obtenidos por Soudant, 1995 en la vieira, podemos describir estrategias de comportamiento de las dos especies durante etapas de su vida larvaria en función de los ácidos grasos que más se demandan en lípidos polares (membranas/crecimiento), o en lípidos neutros (reservas/almacenamiento) (Tablas XIX y XX).

Para *Venerupis pullastra*, los resultados proceden de las Tablas XLII, XLIV, XLVI y XLVIII (Apéndice) correspondientes a los análisis de ácidos grasos en el período comprendido de larva D a larva veliger de 8 y 7 días para dos cultivos buenos estudiados: cultivo mejor y bueno. En el caso de *Pecten maximus*, al observarse un período mixotrófico, se toman los datos correspondientes al período comprendido entre larvas de 5 días y larvas de 9 días (Tablas LVI y LVII del Apéndice).

La almeja babosa muestra, a partir de la larva D un comportamiento típico de una larva veliger, alimentándose del fitoplancton marino, etapa planctotrófica, no observándose un período mixotrófico claro.

Esta afirmación se sustenta por el incremento positivo en ácidos grasos polares y neutros observado en los dos cultivos buenos a partir del día 2.

En vieira, el período planctotrófico claro comienza a partir del día 5, habiendo previamente una etapa de reestructuración tisular caracterizada por una ausencia de crecimiento (descenso de AGTs en lípidos de membrana) y consumo energético (descenso de AGTs en los lípidos de reserva), como ya hemos indicado en el apartado anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XIX: Evolución de los ácidos grasos por día en lípidos de membrana (LP) en presencia de alimento exógeno: De la larva D a larva veliger de 8 y de 7 días en *Venerupis pullastra* y de larva veliger de 5 días a larva pediveliger de 9 días en *Pecten maximus*.

	<i>Venerupis pullastra</i>		<i>Pecten maximus</i>	
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Larva D Lv 5 Días	Lv 5 Días
	Larva D Lv 8 Días	Larva D Lv 7 Días	(F. Mixotrófica)	Lv 9 Días
ng AGTs LP	1,714 Lv D	0,862 Lv D	1,517 Lv D	1,143 Lv 5 Días
ng AGTs LP	4,935 Lv 8 Días	2,946 Lv 7 Días	1,143 Lv 5 Días	2,644 Lv 9 Días
Δ Total	537 pg	417 pg	-124 pg	375 pg
Ganancia AGTs	538 pg	418 pg	6 pg	375 pg
Pérdida AGTs	-1 pg	-1 pg	-130 pg	---
Δ 16:0	114 pg (21,2%)	70 pg (17,0%)	-17 pg (-13,1%)	55 pg (14,7%)
Δ EPA	64 pg (11,9%)	17 pg (4,1%)	-40 pg (-30,8%)	48 pg (12,8%)
Δ 18:0	54 pg (10,0%)	27 pg (6,6%)	-8 pg (-6,2%)	32 pg (8,5%)
Δ DHA	53 pg (9,9%)	107 pg (26,0%)	-32 pg (-24,6%)	82 pg 21,9%)
Δ 20:2(n-6)	46 pg (8,6%)	28 pg (6,8%)	---	3 pg (0,8%)
Σ 5 AG (%)	61,6%	60,5%	-74,7%	58,7%

Tabla XX: Evolución de los ácidos grasos por día en lípidos de reserva (LN) en presencia de alimento exógeno: De larva D a larva veliger de 8 días y de 7 días en *Venerupis pullastra* y de larva veliger de 5 días a larva pediveliger de 9 días en *Pecten maximus*.

	<i>Venerupis pullastra</i>		<i>Pecten maximus</i>	
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Larva D Lv 5 Días	Lv 5 Días
	Larva D Lv 8 Días	Larva D Lv 7 Días	(P. Mixotrófico)	Lv 9 Días
ng AGTs LN	2,099 Lv D	2,061 Lv D	3,263 Lv D	0,603 Lv 5 Días
ng AGTs LN	7,088 Lv 8 Días	2,531 Lv 7 Días	0,603 Lv 5 Días	3,668 Lv 9 Días
Δ Total	832 pg	94 pg	-887 pg	766 pg
Ganancia AGTs	832 pg	156 pg	1 pg	766 pg
Pérdida AGTs	---	-62 pg	-888 pg	---
Δ 16:0	143 pg (17,2%)	-23 pg (-32,4%)	-190 pg (-21,4%)	119 pg (15,5%)
Δ 14:0	141 pg (16,9%)	27 pg (18,4%)	-60 pg (-6,8%)	116 pg (15,1%)
Δ 16:1(n-7)	64 pg (7,7%)	-6 pg (-8,5%)	-95 pg (-10,7%)	72 pg (9,4%)
Σ 3 AG (%)	41,8%			40,0%
Δ 18:2(n-6)	74 pg (8,9%)	11 pg (7,1%)	-31 pg (-3,5%)	52 pg (6,8%)
Δ 18:3(n-3)	65 pg (7,8%)	32 pg (21,9%)		29 pg (3,8%)
Δ 18:4(n-3)	54 pg (6,5%)	29 pg (19,9%)		38 pg (5,0%)
Δ EPA	59 pg (7,1%)	-19 pg (-26,8%)	-159 pg (-17,9%)	91 pg (11,9%)
Δ DHA	28 pg (3,4%)	35 pg (24,0%)	-73 pg (-8,2%)	87 pg (11,4%)
Σ 5 AG (%)	33,7%			38,9%

2.4.1.1.- Estrategia en almeja babosa (*Venerupis pullastra*)

En el cultivo mejor el incremento en AGTs de membranas se produce a razón de 537 pg/día y de 417 pg/día en el cultivo bueno (Tabla XIX).

Esta diferencia se corresponde, a su vez, con un mejor acúmulo de AGTs en los lípidos de reserva en el cultivo mejor, incremento de 832 pg/día, por tan sólo 94 pg/día en el bueno, que se traduce, en las diferencias en peso seco/larva, observado a lo largo de los cultivos.

Así una larva de 8 días del cultivo mejor, tiene un peso seco de aproximadamente el doble que una larva de 7 días del cultivo bueno (1.000 µg frente a 529 µg para un tamaño de 152 µm).

Los datos obtenidos de la alimentación aportada a ambos cultivos en el período de tiempo analizado indican que, las diferencias de peso seco pueden deberse a la distinta ración aportada en ambos cultivos (Tabla XXI).

Tabla XXI: Cantidades de microalgas aportadas a los cultivos 1 y 2 en función del número de larvas presentes en los mismos, así como del día de cultivo. Los desfases (f: desfase entre los cultivos; F: desfase entre los días en un mismo cultivo) hacen referencia a las diferencias de ración por larva.

	Cultivo mejor (2)	Cultivo bueno (1)	Desfase f (Cultivo)
Día 2	2.441 µalgas/larva	1.427 µalgas/larva	1,7 veces más cultivo mejor (2)
Día 15	12.109 µalgas/larva	7.488 µalgas/larva	1,6 veces más cultivo mejor (2)
Desfase F (Día)	5,0 veces más día 15	5,2 veces más día 15	

El mejor crecimiento obtenido en el cultivo 2 se debe a una mayor ración de microalgas aportada por larva en el cultivo (1,7 veces más de

ración desde el comienzo del desarrollo larvario), lo que origina que las larvas del 8º día del cultivo 2, pesen casi el doble que las de 7º día del cultivo 1.

El mejor crecimiento correspondiente al cultivo 2 se produce cuando en membranas se incorporan 5 ácidos grasos mayoritarios, representando el 61,6 % del total de ácidos grasos incorporados en esta fase planctotrófica.

Estos ácidos grasos son:

- Ácido palmítico, 16:0, el 21,2 % de los AGTs
- Ácido eicosapentaenoico, 20:5(n-3), el 11,9 %
- Ácido esteárico, 18:0, el 10,0 %
- Ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3), el 9,9 % y
- Ácido eicosadienoico, 20:2(n-6), el 8,6 %

Estos cinco ácidos grasos representan un porcentaje similar del total de ácidos grasos presentes en membrana en el cultivo bueno (60,5 %), siendo en este caso en los HUFAs, mayor el porcentaje de DHA incorporado y menor el de EPA. En los SAFAs es menor el porcentaje en ambos (16:0 y 18:0) y en los PUFAs, el 20:2(n-6) se incorpora a razón de 28 pg/día, frente a los 46 pg/día del cultivo mejor.

En el cultivo mejor no hay limitación ni de ácidos grasos con un papel eminentemente energético (SAFAs y MUFAs), ni de aquellos que se puedan demandar como sillares estructurales en la construcción de membranas.

Así de los 5 ácidos grasos que más repercuten en los AGTs de membranas, únicamente el 18:0 y el 20:2(n-6) no se encuentran entre los que más se acumulan en lípidos de reserva. Los tres restantes 16:0, EPA y DHA se han seguido acumulando a pesar de haber sido fuertemente demandados en la construcción de membranas.

El 18:0 puede sintetizarse a partir del 16:0 por simple elongación, mientras que el 20:2(n-6) es el producto del 18:2(n-6) que, vía ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$, generaría como producto final el ARA (Tabla XXII), lo que confirmaría la funcionalidad de ésta ruta en larvas veliger de *Venerupis pullastra* expuesta en la fase anterior.

Tabla XXII: Porcentaje de elongación en el paso de 18:2(n-6) a 20:2(n-6) correspondiente a la hipotética funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ para las dos especies estudiadas de bivalvos en el paso de Larva D a larva de 8-7 días y 5 días en *Pecten maximus*.

Ruta $\omega 6\Delta^8$	<i>V. pullastra</i>		<i>P. maximus</i>
LÍPIDOS MEMBRANA	2	1	
$\Delta 18:2(n-6)$	11 pg	8 pg	-5 pg
$\Delta 20:2(n-6)$	46 pg	28 pg	-0,7 pg
% de elongación*	80,7%	77,8%	---

* % elongación = (producto / (producto + sustrato) x 100).

Los porcentajes de elongación en los cultivos mejor y bueno de almeja babosa son similares, 80,7 % y 77,8 %, respectivamente.

Al ser el 18:2(n-6) un EFA, la formación de 20:2(n-6) en las membranas sólo sería soportada por un aporte adecuado de su precursor que, evidentemente, se transvasaría del acumulado en lípidos de reserva procedente de la alimentación.

Nuestros resultados muestran en el cultivo mejor un mayor acúmulo de 18:2(n-6) en lípidos de reserva, a pesar de su importante demanda para la formación de 20:2(n-6) en membranas. Sin embargo en el cultivo 1, incluso descienden en sus reservas.

La menor incorporación de EPA en lípidos polares en el cultivo bueno puede ser debido al papel que este ácido graso presenta como almacén de energía cuando se encuentra en la estructura de la fosfatidilcolina en lípidos polares, como indicamos en la Introducción.

En el cultivo bueno es patente el consumo de algunos ácidos grasos en lípidos neutros para mantener el incremento en membranas (lípidos polares). Este gasto debe ser reflejo por un lado, del transvase de sillares estructurales (ácidos grasos) para la síntesis de los fosfolípidos de membrana y por otro lado, del consumo de los mismos que nos permitan obtener energía para llevar a cabo estos procesos biosintéticos.

Datos referentes al almacenamiento de lípidos en zooplancton marino (Lee y col., 2006) ponen de manifiesto las siguientes afirmaciones.

Por una parte los fosfolípidos son componentes clave en las biomembranas. En zooplancton, estos lípidos polares contienen 3 ácidos grasos mayoritarios 22:6(n-3), 20:5(n-3) y 16:0, en gran parte independientes de los cambios que acontezcan en su dieta (Lee y col., 1971a; Falk-Petersen y col., 2000).

Uno de los fosfolípidos más importantes, la fosfatidilcolina, parece servir como almacén de lípidos en Euphausiids de altas latitudes, tales como *Euphausia superba*, *Euphausia cystallorophias* y *Thysanoessa macrura* (Hagen y col., 1996; Mayzaud, 1997).

En la lipovitelina de crustáceos, la fosfatidilcolina es el principal lípido proponiéndose una transferencia de fosfatidilcolina a la lipovitelina de Euphausiids durante la reproducción (Lee y col., 2006).

Por otro lado, habitualmente en los fosfolípidos de membrana, en posición 1 se encuentra un ácido graso saturado y en la posición 2 uno insaturado (Hadley, 1985). Esta distribución asimétrica de los ácidos grasos tiene una importancia extrema en el papel estructural y funcional de las membranas.

Fosfolípidos del zooplancton difieren de este esquema debido a que su contenido en PUFAs, excede ampliamente al de SAFAs (Albers y col., 1996). Por ello aparecen en la posición 1 PUFAs, particularmente el 20:5(n-3) en la fosfatidilcolina (Kattner, 1991).

Estos datos parecen indicar que el 20:5(n-3) en la posición 1 de la fosfatidilcolina, podría jugar un papel estructural y/o energético en función de las necesidades del momento.

Estos resultados están claramente relacionados con los datos obtenidos en lípidos de reserva.

Así en el cultivo 1, a pesar del buen incremento en los AGTs de lípidos polares (417 pg/día), en lípidos de reserva tan sólo se han acumulado 94 pg/día, lo que sugiere una limitación leve en cuanto al fitoplancton aportado.

Si esta hipótesis es correcta, el aumento en los ácidos grasos más representativos en lípidos de membrana no debería verse afectado de forma severa, y sí que observaríamos menor acúmulo o incluso gasto en aquellos ácidos grasos más demandados, como son los que pueden emplearse como fuente energética para los procesos biosintéticos y los que son empleados como sillares estructurales para la construcción de membranas.

Nuestros resultados en este cultivo muestran bajadas en los lípidos de reserva en el siguiente orden de importancia, para los siguientes ácidos grasos:

- 16:0
- 20:5(n-3)
- 18:2(n-6)
- 16:1(n-7)

Pero aumentos moderados en:

- 22:6(n-3)
- 18:3(n-3)
- 14:0

La limitación en EPA se compensaría con su sustitución en membranas con DHA.

El déficit en aporte de 18:2(n-6) se traduce en su consumo en reservas para mantener la funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ y asegurar la presencia en lípidos de membrana del 20:2(n-6), uno de los ácidos grasos más representativos de la membrana de la almeja babosa en esta etapa de su vida larvaria.

En el cultivo mejor, los ácidos grasos que, en mayor cuantía intervienen en el incremento de lípidos de reserva, son:

- 16:0
- 14:0 y
- 16:1(n-7), representando estos tres ácidos grasos el 41,8 % del total de ácidos grasos

Estos ácidos grasos mayoritarios, excepto el 14:0, en el cultivo bueno, no se almacenan, al contrario, se consumen, lo que provoca el menor acúmulo de AGTs en los lípidos neutros.

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados observamos un acúmulo de los EFAs 18:2(n-6) y 18:3(n-3) en el cultivo mejor, indicando estos datos un suficiente aporte de los mismos en la dieta. Sin embargo en el cultivo bueno, parece existir una limitación parcial, descendiendo incluso el contenido en 18:2(n-6) acumulado. En este caso, las larvas veliger del cultivo 1, no ven satisfechas sus necesidades en este ácido graso por la alimentación, teniendo que tomarlo del previamente acumulado en los lípidos neutros.

En nuestros datos para larvas de *Venerupis pullastra*, éste ácido graso en el cultivo mejor, se almacena en reservas, mientras que en el cultivo bueno se gasta, descendiendo su contenido en lípidos neutros y apareciendo, en menor cantidad, en lípidos polares.

Esto vendría a corroborar la función de combustible energético secundario del EPA, ya que en el cultivo bueno, para mantener la tasa de crecimiento de 441 pg/día en AGTs de membrana, se ha tenido que echar mano de las reservas lipídicas almacenadas que pueden ser empleadas como combustible para la generación de biomembranas. Del 16:0 dentro de los SAFAs, del 16:1(n-7) entre los MUFAs y del 20:5(n-3) como posible combustible entre los PUFAs.

Estos datos sugieren:

1.- Una limitación lipídica en la ración alimenticia aportada al cultivo 1 ya que la dieta en ambos cultivos es idéntica

2.- Una menor capacidad biosintética de ácidos grasos por:

- Limitación de precursores (p. ej. Acetil-CoA) y/o
- Limitación de precursores esenciales que sólo pueden aportarse por la dieta [p. ej. 18:2(n-6)].

2.4.1.2.- Estrategia en vieira (Pecten maximus)

Con respecto a la especie a comparar, observamos que su comportamiento es típicamente planctotrófico, a partir del día 5 (Tablas XIX y XX).

Las larvas incrementan sus AGTs en lípidos de membrana a razón de 375 pg/día (537 pg/día en la almeja babosa en el cultivo mejor) y acumulan AGTs en lípidos de reserva a razón de 766 pg/día (832 pg/día en la almeja babosa en el cultivo mejor) indicando un aporte satisfactorio en la dieta microalgal.

Estos datos se corresponden a los obtenidos hasta larvas de 9 días para compararlos con larvas de 8 días de almeja babosa del cultivo mejor.

En cuanto a los ácidos grasos mayoritarios en sus lípidos polares observamos que, de los 5 ácidos grasos mayoritarios, el 20:2 (n-6) pasa a tener un menor peso específico (0,8 % en larvas de vieira frente a 8,6 % en larvas de almeja babosa), representando los 4 restantes el 57,9 % de los AGTs incrementados (en almeja babosa el $\Sigma 5$ AG es de 61,6 % de los AGTs).

Esto vuelve a corroborar la mínima o nula funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ en larvas de vieira comparándola con la observada en larvas de almeja babosa.

En cuanto a los otros cuatro ácidos grasos el que más se incrementa es el DHA, duplicando casi el aumento del EPA y teniendo un papel secundario el 16:0 si lo comparamos con el observado en la almeja babosa.

2.4.2.- Comportamiento de la larva veliger

Se corresponde en si, a la verdadera vida planctotrófica donde se lleva a cabo el desarrollo larvario que origina una larva lista para metamorfosear y transformarse en un joven adulto.

Este es un período claramente exotrófico, donde la larva crece y almacena reservas para superar la metamorfosis (período de no alimentación, endotrófico) y transformarse en una postlarva con las estructuras típicas de un adulto que le permitan de nuevo alimentarse de los nutrientes presentes en el medio marino.

Las Tablas XXIII y XXIV comparan los cultivos 2, 1 y 3 de la almeja babosa (*V. pullastra*) con los de vieira (*P. maximus* de la tesis de Soudant), para esta etapa de larva veliger temprana a pediveliger, en los lípidos de membrana y de reserva, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XXIII: Evolución de los ácidos grasos por día en lípidos de membrana (LP) para las dos especies en presencia de alimento exógeno. Desde larva veliger temprana a larva pediveliger. Los datos se expresan en pg por día de cultivo.

	<i>Venerupis pullastra</i>			<i>Pecten maximus</i>
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Cultivo 3 Peor	Lv 9 Días Lv 19 Días
	Lv 8 Días Lv 15 Días	Lv 7 Días Lv 15 Días	Lv 6 Días Lv 22 Días	
ng AGTs LP	4,935 Lv 8 Días	2,946 Lv 7 Días	1,481 Lv 6 Días	2,644 Lv 9 Días
ng AGTs LP	20,641 Lv 15 Días	8,333 Lv 15 Días	21,287 Lv 22 Días	4,932 Lv 19 Días
Δ Total	2.244 pg	673 pg	1.238 pg	229 pg
Ganancia AGTs	2.244 pg	673 pg	1.238 pg	232 pg
Pérdida AGTs	---	---	---	-3 pg
Δ 16:0	562 pg (25,0%)	176 pg (26,2%)	220 pg (17,8%)	31 pg (13,4%)
Δ DHA	278 pg (12,4%)	140 pg (20,8%)	323 pg (26,1%)	62 pg 26,7%)
Δ 18:0	241 pg (10,7%)	58 pg (8,6%)	102 pg (8,2%)	24 pg (10,3%)
Δ EPA	207 pg (9,2%)	16 pg (2,4%)	101 pg (8,2%)	28 pg (12,1%)
Σ 4 AG (%)	57,3%	58,0%	60,3%	62,5%
Δ 18:1(n-9)	102 pg (4,5%)	32 pg (4,8%)	37 pg (3,0%)	15 pg (6,5%)
Δ 18:1(n-7)	79 pg (3,5%)	38 pg (5,6%)	51 pg (4,1%)	13 pg (5,6%)
Δ 20:2(n-6)	84 pg (3,7%)	30 pg (4,5%)	47 pg (3,8%)	-2 pg (-0,9%)
Δ ARA	97 pg (4,3%)	12 pg (1,8%)	38 pg (3,1%)	3 pg (1,3%)
Σ 5 AG (%)	73,3%	74,7%	74,3%	75,0%

Tabla XXIV: Evolución de los ácidos grasos por día en lípidos de reserva (LN) para las dos especies en presencia de alimento exógeno. Desde larva veliger temprana a larva pediveliger. Los datos se expresan en pg por día de cultivo.

	<i>Venerupis pullastra</i>			<i>Pecten maximus</i>
	Cultivo 2 Mejor	Cultivo 1 Bueno	Cultivo 3 Peor	Lv 9 Días Lv 19 Días
	Lv 8 Días Lv 15 Días	Lv 7 Días Lv 15 Días	Lv 6 Días Lv 22 Días	
ng AGTs LN	7,088 ng Lv 8 días	2,531 ng Lv 7 días	2,562 ng Lv 6 días	3,668 Lv 9 días
ng AGTs LN	14,385 ng Lv 15 días	5,555 ng Lv 15 días	66,658 ng Lv 22 días	15,648 Lv 19 días
Δ Total	1.043 pg	378 pg	4.006 pg	1.198 pg
Ganancia AGTs	1.065 pg	378 pg	4.006 pg	1.200 pg
Pérdida AGTs	-22 pg	---	---	-2 pg
Δ 16:0	289 pg (27,1%)	80 pg (21,0%)	602 pg (15,0%)	177 pg (14,8%)
Δ 14:0	229 pg (21,5%)	36 pg (9,4%)	260 pg (6,5%)	141 pg (11,8%)
Δ 18:0	85 pg (8,0%)	23 pg (6,0%)	150 pg (3,7%)	26 pg (2,2%)
Σ 3 AG (%)	56,6%	36,4%	25,2%	28,8%
Δ 16:1(n-7)	92 pg (8,6%)	28 pg (7,3%)	678 pg (16,9%)	89 pg (7,4%)
Δ 18:1(n-9)	39 pg (3,7%)	33 pg (8,7%)	238 pg (5,9%)	108 pg (9,0%)
Δ 18:1(n-7)	53 pg (5,0%)	28 pg (7,3%)	327 pg (8,2%)	78 pg (6,5%)
Σ 3 AG (%)	17,3%	23,3%	31,0%	22,9%
Δ 18:2(n-6)	-10 pg (-1,0%)	11 pg (2,9%)	221 pg (5,5%)	74 pg (6,2%)
Δ 18:3(n-3)	-7 pg (-0,7%)	9 pg (2,4%)	233 pg (5,8%)	59 pg (4,9%)
Δ 18:4(n-3)	-1 pg (-0,1%)	21 pg (5,5%)	281 pg (7,0%)	129 pg (10,8%)
Δ EPA	23 pg (2,2%)	19 pg (5,0%)	275 pg (6,9%)	134 pg (11,2%)
Δ DHA	4 pg (0,4%)	26 pg (6,8%)	370 pg (9,2%)	119 pg (9,9%)
Σ 5 AG (%)	0,8%	22,6%	34,4%	43,0%

En el cultivo mejor, las larvas pasan de 1,00 µg PS/larva el día 8 a 3,02 µg PS/larva el día 15 (0,29 µg/día), correspondiéndose con un incremento en AGTs en membranas de 2,244 ng/día.

En el cultivo bueno, las larvas pasan de 0,53 μg PS/larva el día 7 a 1,63 μg PS/larva el día 15 (0,14 $\mu\text{g}/\text{día}$), relacionado con un incremento en AGTs en membranas de 0,673 ng/día.

Las diferencias de crecimiento entre ambos cultivos, se deben a la diferente ración aportada por larva (cuantitativa) ya que cualitativamente la dieta es la misma en los dos cultivos, como vimos en la etapa anterior. En el cultivo mejor a día 15 se dio una ración 1,6 veces mayor que la aportada el mismo día en el cultivo 1 (Tabla XXI).

En el cultivo peor, las larvas pasan de 0,32 μg PS/larva el día 6 a 2,29 μg PS/larva el día 22 (0,12 $\mu\text{g}/\text{día}$), correspondiéndose con un incremento en AGTs en membranas de 1,238 ng/día.

En el cultivo mejor los resultados muestran un constante gasto de ácidos grasos en lípidos neutros transvasándolos a lípidos polares. Esto se produce en mayor grado en aquellos ácidos grasos que proceden de la dieta y que no pueden ser biosintetizados por las larvas, como ocurre en EFAs y PUFAs del tipo EPA y DHA.

También observamos una actividad lipogénica en lípidos de reserva por el aumento del 14:0, 16:0 y 18:0 así como de los productos formados por la actuación de la esteroil-CoA desaturasa (SCD): 18:1(n-9), 16:1(n-7) y del 18:1(n-7).

Esta actividad lipogénica, junto con el almacenamiento de estos SAFAs y MUFAs que procedan de la dieta, permite la construcción de las biomembranas al elevado ritmo que se observa en el cultivo mejor al estar asegurado el combustible (SAFAs, MUFAs y EPA) para los procesos biosintéticos.

En el cultivo bueno, la limitación de combustible debido a la menor ración aportada en este cultivo, provoca una ralentización en el ritmo de construcción de membranas. Esto se traduce en una menor actividad lipogénica en lípidos de reserva.

Esta limitación en los combustibles para la biosíntesis de membranas, repercute claramente en un mayor uso del EPA almacenado en membranas como fuente de energía secundaria para los procesos biosintéticos. La pérdida de EPA en membranas, es compensada con una mayor incorporación del DHA a las mismas.

Por lo tanto en el cultivo mejor, el EPA no se requiere como fuente secundaria de energía para la construcción de biomembranas:

Ganancia de DHA % sobre AGTs	Ganancia de EPA % sobre AGTs	% Σ (EPA+DHA) sobre AGTs
278 pg día ⁻¹ 12,4 %	207 pg día ⁻¹ 9,2 %	21,6 %

Sin embargo en el cultivo bueno, el EPA sí se requiere como fuente secundaria de energía para la construcción de biomembranas:

Ganancia de DHA % sobre AGTs	Ganancia de EPA % sobre AGTs	% Σ (EPA+DHA) sobre AGTs
140 pg día ⁻¹ 20,8 %	16 pg día ⁻¹ 2,9 %	23.7 %

Esto provoca la ralentización en la tasa de crecimiento en este último cultivo, como indicamos anteriormente.

Con respecto al cultivo peor, los resultados muestran un gran acúmulo de AGTs en lípidos neutros (reservas), presentando la peor tasa de crecimiento, alcanzando el estadio pediveliger el día 22, una semana después que en los cultivos buenos.

Se observa una menor actividad lipogénica en los ácidos grasos de los lípidos polares, prioritariamente en los saturados 16:0 y 18:0 (2,5 veces menor la incorporación de ambos con respecto al cultivo mejor). Paradójicamente ambos ácidos grasos se acumulan fuertemente en lípidos neutros (2,5 veces más que en el cultivo mejor).

Este acúmulo en lípidos neutros se traduce en un aumento de sus productos de metabolización: 16:1(n-7), 18:1(n-9) y 18:1(n-7).

El bloqueo de la actividad lipogénica, referida a los fosfolípidos de membranas, provoca un acúmulo de aquellos que se emplean más en la construcción de las biomembranas y que proceden de la dieta (DHA y EPA).

También se acumulan los EFAs, 18:2(n-6) y 18:3(n-3), precursores de los ácidos grasos de las series $\omega 6$ y $\omega 3$.

La causa que origina este problema metabólico, puede tener su origen en la relación LN/LP. Así una relación alta, es decir favorable a la fracción de LN, repercutirá en un mayor almacenamiento de AGTs que reflejen la dieta aportada, o bien a progenitores (caso de ovocitos) o bien a las larvas (durante el desarrollo larvario).

En todo caso, las microalgas marinas son ricas en PUFAs de la serie $\omega 3$. Un exceso en la dieta de estos PUFAs, tiene repercusiones metabólicas, produciendo una inhibición en los procesos lipogénicos conducentes a la síntesis de fosfolípidos y ésteres de colesterol.

Ello provocaría una ralentización en el crecimiento de las larvas en su etapa de vida lecitotrófica con un menor gasto de sus reservas en lípidos neutros.

También provocaría una ralentización en el crecimiento durante su etapa de vida planctotrófica, acumulándose aún más lípidos neutros (larva grasa) debido al bajo empleo de los AGTs de ésta fracción (PUFAs fundamentalmente).

El cultivo peor sería un ejemplo claro, así los ovocitos de este cultivo, tienen aproximadamente 1,5 veces más de lípidos neutros y el doble de PUFAs (n-3) que los cultivos buenos.

Durante el desarrollo larvario, el cultivo va más lento y las larvas pediveliger son más grasas (76 % de AGTs en lípidos de reserva frente a un 24 % de AGTs en lípidos de membrana) que las obtenidas en los cultivos buenos (larvas magras), con una relación 40/60.

2.4.2.1.- Estrategia en la almeja babosa (Venerupis pullastra)

La almeja babosa incrementa sus AGTs de membrana representando 4 ácidos grasos más de la mitad del aumento obtenido en el total (57,3 % en el cultivo mejor, 58,0 % en el cultivo bueno y 60,3 % en el cultivo peor.

Estos cuatro ácidos grasos y por orden de importancia, son:

- 16:0, mayoritario
- DHA
- 18:0
- EPA

Es interesante analizar la evolución de los ácidos grasos mayoritarios hasta la consecución de la larva pediveliger (día 15 en los cultivos mejores), día 22 en el cultivo peor.

De todos ellos, el 16:0 representa el 25-26 % de los AGTs incorporados en lípidos de membrana en los cultivos buenos, bajando al 18 % en el cultivo peor.

Esto los convierte en los ácidos grasos que más requieren las larvas pediveliger en sus biomembranas, y sería lógico pensar que, la abundancia de dichos ácidos grasos en lípidos de reserva y por lo tanto en la dieta, mejorará los procesos de transformación de veliger a pediveliger.

Por otro lado, cabe destacar la importancia de otros 4 ácidos grasos que, con los cuatro anteriores representan entre el 73 y el 75 % del total de

ácidos grasos en los diferentes cultivos que juegan un papel clave en el paso a pediveliger y son:

- 18:1(n-9)
- 18:1(n-7)
- 20:2(n-6)
- ARA

En esta etapa, otra vez el 20:2(n-6) puede ser el producto del 18:2(n-6) por la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ que generaría como producto final el ARA (Tabla XXV), lo que terminaría de confirmar la funcionalidad de esta ruta en *Venerupis pullastra*.

Tabla XXV: Porcentaje de elongación en el paso de 18:2(n-6) a 20:2(n-6) correspondiente a la hipotética funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ para las dos especies comparadas de bivalvos en el paso de larva veliger a pediveliger.

Ruta $\omega 6 \Delta^8$	<i>V. pullastra</i>			<i>P. maximus</i>
LÍPIDOS MEMBRANA	2	1	3	
Δ 18:2(n-6)	30 pg	7 pg	15 pg	3 pg
Δ 20:2(n-6)	84 pg	30 pg	47 pg	-2 pg
% de elongación*	74%	81%	76%	---

* % elongación = (producto / (producto + sustrato) x 100).

La limitación en la ración se refleja en lípidos de reserva con una menor acumulación. En el cultivo mejor hay una ganancia total 1.043 pg/día en AGTs de reserva, mientras que en el cultivo bueno, tan sólo es de 378 pg/día.

2.4.2.2.- Estrategia en la vieira (*Pecten maximus*)

Los datos referidos a la especie a comparar, muestran un comportamiento planctotrófico claro durante su etapa de vida veliger (día 9) hasta la formación de la larva pediveliger que, en este caso, es del día 19.

Sin embargo, se observan diferencias con la almeja babosa, en cuanto a las estrategias que desarrollan para alcanzar dicho estadio.

La almeja babosa prioriza su desarrollo larvario en crecer y alcanzar lo más rápidamente su estadio pediveliger para metamorfosear y transformarse en un joven adulto (postlarva), así a día 15 ha completado este proceso en los cultivos buenos.

Lo hace a expensas de emplear el alimento ingerido utilizándolo para los procesos biosintéticos de dos formas. Por un lado, procurando tener suficientes moléculas combustibles para generar energía y por otro como poder reductor para los procesos biosintéticos.

Así mismo procura tener un amplio stock de aquellas biomoléculas esenciales debido a su incapacidad para biosintetizarlas (p. ej. EFAs) o a su pequeña capacidad para biotransformarlas a partir de sus precursores (p. ej. EPA y DHA).

Esto repercute en que emplea prioritariamente el alimento en crecer, siendo secundario el almacenar reservas para los siguientes estadios. Del total de ácidos grasos mayoritarios presentes en larvas pediveliger, sólo el 41 % se encuentran en lípidos neutros (larva magra).

Sin embargo, la vieira no prioriza su estrategia en un crecimiento rápido. Como vimos anteriormente en la fase lecitotrófica, ésta se prolonga en el tiempo dando lugar a un período mixotrófico, no observándose un período claro planctotrófico, hasta el día 9 (ver etapa anterior).

Durante la fase lecitotrófica, el alimento ingerido lo prioriza más para almacenamiento en reservas que para crecimiento provocando que, del total de ácidos grasos mayoritarios presentes en larvas pediveliger, aproximadamente el 80 % se encuentran en lípidos neutros (larva grasa).

En la siguiente Tabla se muestran las diferencias que nos permiten hablar de estos dos tipos de larvas en las dos especies.

	<i>Venerupis pullastra</i> Cultivo mejor (2)	<i>Pecten maximus</i> (Tesis Soudant)
	Pediveliger Día 15	Pediveliger Día 19
Longitud (µm)	254	195
AGTs LP (Crecimiento)	20,641 ng*	4,932 ng*
AGTs LN (Reservas)	14,385 ng	15,648
%LN/AGTs	41,1 %*	79,9 %*

* AGTs sin contar los derivados de plasmalógenos.

En cuanto a las necesidades en ácidos grasos para generar sus bio-membranas, observamos ciertas similitudes con la almeja babosa.

Las larvas pediveliger incorporan en sus membranas los mismos ácidos grasos mayoritarios:

- 16:0
- DHA
- 18:0
- EPA

El porcentaje que representan estos ácidos grasos incorporados sobre el total en las biomembranas de la larva pediveliger, es similar al obtenido en almeja babosa (57,3 % cultivo mejor por 62,5 % en vieira).

Existen diferencias cuantitativas, en lo referente a cuáles son los más incorporados en ambas especies. En la almeja babosa predomina la incorporación del 16:0 (sólo el 13,4 %), mientras que en la vieira es el DHA (26,7 %).

Se incrementan también en membranas otros cuatro ácidos grasos minoritarios, que junto con los anteriores, van a representar el 75,0 % de AGTs que más se incorporan en las biomembranas de larvas pediveliger de vieira, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 20:2(n-6) y ARA.

De los cuatro, el 18:1(n-9) y el 18:1(n-7) suman claramente el 62,5 %. El ARA tiene un aumento poco significativo, mientras que el 20:2(n-6) incluso descende, lo que corrobora la nula funcionalidad de la ruta metabólica $\omega 6\Delta^8$ en lípidos polares de la vieira.

La diferencia más clara estriba en que en el cultivo mejor de la almeja babosa, se incorporan a razón de 2.244 pg/día de AGTs en sus lípidos de membrana hasta la formación de la larva pediveliger (desde el día 8 al día 15) mientras que la vieira, incorpora 10 veces menos sus AGTs (229 pg/día), lo que se traduce en una menor tasa de crecimiento y en un mayor tiempo para alcanzar el estadio pediveliger (desde día 9 al día 19).

Resumiendo y comparando estrategias en la transformación de larva veliger temprana a pediveliger podemos indicar:

1.- La estrategia en la vieira es acumular AGTs (principalmente PUFAs) en sus lípidos de reserva, reflejando el perfil de la dieta microalgal (Tabla XXVI)

Tabla XXVI: Datos referidos a los ácidos grasos mayoritarios del alimento aportado por la dieta PTS (*Paulova* o *Monochrysis*, *Isochrysis T-iso* y *Skeletonema*) en el desarrollo larvario de *P. maximus* (expresados en %), así como al incremento de los mismos en lípidos neutros (reserva), en lípidos polares (membrana) y lípidos totales entre el día 9 y el día 19 del cultivo (larvas planctotróficas). Los incrementos diarios se expresan en pg/larva y en porcentajes.

	Alimento	Δ LP		Δ LN		Δ LT	
	% PTS	%	Pg/lv	%	pg/lv	%	Pg/lv
14:0	12,8	0,3	5	9,8	141	10,1	146
16:0	11,1	2,2	31	12,3	177	14,5	208
18:0	0,7	1,7	24	1,8	26	3,5	50
Σ SAFAs	24,6	4,2	60	23,9	344	27,1	404
16:1(n-7)	11,0	0,3	4	6,2	89	6,5	93
18:1(n-9)	4,9	1,0	15	7,5	108	8,5	123
18:1(n-7)	1,1	0,9	13	5,4	78	6,3	91
20:1(n-11)		0,1	1	0,1	1	0,2	2
20:1(n-9)		0,4	6	0,6	8	1,0	14
20:1(n-7)		0,1	1	0,2	3	0,3	4
Σ MUFAs	17,0	2,8	40	20,0	287	22,8	327
18:2(n-6)	4,6	0,2	3	5,2	74	5,4	77
18:2(n-4)	0,1	0,1	1	0,3	5	0,4	6
18:3(n-6)	1,0	0,1	1	0,8	12	0,9	13
18:3(n-3)	4,2	0,3	5	4,1	59	4,4	64
18:4(n-3)	9,5	0,8	11	9,0	129	9,8	140
20:2(n-6)	0		-1,7				-1,7
20:3(n-6)		0,1	1	0,1	2	0,2	3
ARA	0,4	0,2	3	0,3	5	0,5	8
20:4(n-3)				0,1	1	0,1	1
EPA	17,1	2,0	28	9,3	134	11,3	162
21:4(n-6)		0,1	1	0,2	3	0,3	4
21:5(n-3)		0,1	2	0,3	5	0,4	7
22:5(n-6)		1,0	14	1,4	20	2,4	34
22:5(n-3)	1,1	0,1	1	0,1	2	0,2	3
DHA	11,1	4,3	62	8,3	119	12,6	181
Σ PUFAs	49,1	9,4	71	39,5	570	48,9	703
							1.434

2.- La almeja babosa tiende a utilizar los AGTs procedentes de la dieta microalgal en la construcción de biomembranas, reflejando su perfil en los lípidos estructurales (Tabla XXVII) y siendo los EFAs y los HUFAs (EPA y DHA), los más demandados en los desarrollos larvarios buenos. Los datos que se muestran corresponden al cultivo mejor

Tabla XXVII: Datos referidos a los ácidos grasos mayoritarios del alimento aportado por la dieta (Monochrysis, Isochrysis, Chaetoceros y Tetraselmis) en el cultivo mejor de almeja babosa (expresados en %), así como al incremento de los mismos en lípidos neutros (reserva) y en lípidos polares (membrana) y lípidos totales entre el día 8 y el día 15 del cultivo (larvas planctotróficas). Los incrementos diarios se expresan en pg/larva y en porcentajes.

	Alimento	Δ LP		Δ LN		Δ LT	
	% PTS	%	pg lv	%	pg lv	%	pg lv
14:0	24,4	2,0	64,8	7,0	229,1	8,9	293,8
16:0	11,6	17,1	562,0	8,8	289,3	25,9	851,3
18:0	1,1	7,3	241,3	2,6	84,9	9,9	326,2
Σ SAFAs	37,1	26,4	868,2	18,4	603,1	44,8	1471,2
16:1(n-7)	17,5	1,5	50,7	2,8	91,7	4,3	142,4
18:1(n-9)	6,3	3,1	101,5	1,2	39,5	4,3	141,0
18:1(n-7)	1,4	2,4	78,6	1,6	52,7	4,0	131,3
20:1(n-11)	0,0	1,2	38,0	1,0	33,5	2,2	71,5
20:1(n-9)	0,1	1,4	46,5	0,3	11,1	1,8	57,6
20:1(n-7)	0,0	0,7	23,4	0,2	5,9	0,9	29,3
Σ MUFAs	25,3	10,3	338,9	7,1	234,3	17,4	573,2
18:2(n-6)	4,8	0,9	29,8	-0,3	-10,0	0,6	19,8
18:2(n-4)	0,0	0,1	4,0	-0,1	-4,2	0,0	-0,2
18:3(n-6)	1,0	0,4	13,9	0,4	14,1	0,8	27,9
18:3(n-3)	6,2	1,0	33,0	-0,2	-7,3	0,8	25,7
18:4(n-3)	8,3	1,0	31,6	0,0	-0,6	0,9	31,0
20:2(n-6)	0	2,6	84,4	0,4	13,4	3	97,8
20:3(n-6)	0,0	0,3	11,3	0,1	3,8	0,5	15,1
ARA	1,9	3,0	97,5	0,8	25,7	3,7	123,2
20:4(n-3)	0,0	0,3	10,2	0,1	2,4	0,4	12,7
EPA	7,5	6,3	206,7	0,7	23,2	7,0	229,9
21:4(n-6)	0,2	0,8	26,3	0,4	13,0	1,2	39,3
21:5(n-3)	0,0	2,0	64,6	0,4	14,1	2,4	78,7
22:5(n-6)	0,8	2,1	68,5	2,7	88,8	4,8	157,3
22:5(n-3)	0,4	1,1	36,2	0,3	9,5	1,4	45,7
DHA	6,7	8,5	278,3	0,1	4,0	8,6	282,3
Σ PUFAs	37,6	31,5	1036,8	6,2	205,0	37,8	1241,8
							3286,170

3.- Cuando hay limitación en la ración, se ralentiza el crecimiento al no aportarse combustible suficiente para los procesos biosintéticos. Esto se traduce en un transvase más lento de los EFAs y HUFAs hacia membranas y a la sustitución del EPA por DHA, al ser el primero, fuente de energía secundaria en estados limitantes (ayuno, dieta escasa etc.), sería el caso del cultivo bueno

4.- Por último, dietas que excedan el aporte de n-3, pueden tener un efecto negativo al provocar una inhibición de la actividad lipogénica y consiguientemente un mayor ralentizamiento del desarrollo larvario. Sería el caso del cultivo peor, cuyos ovocitos parten con el doble de contenido en n-3 que en los cultivos buenos. El resultado final hace que se acumulen estos ácidos grasos así como aquellos que van a ser empleados como fuente de energía primaria para los procesos biosintéticos (SAFAs y MUFAs)

2.4.3.- Comportamiento de la postlarva

Corresponde con una etapa de metamorfosis y por lo tanto de ayuno, empleando las reservas almacenadas en el organismo.

Posteriormente y una vez desaparecido el órgano natatorio-alimenticio o velum (larva pediveliger) y formadas las branquias en la postlarva, ésta se alimenta del fitoplancton marino, pasando a ser un organismo sésil y filtrador.

En las Tablas XXVIII y XXIX se representan las evoluciones en lípidos polares y neutros para las dos especies comparadas (*Venerupis pullastra* y *Pecten maximus*) según los datos obtenidos en nuestro estudio y los aportados por Soudant en su tesis (1995).

Tabla XXVIII: Evolución de los ácidos grasos en lípidos de membrana (LP) para las dos especies en presencia de alimento exógeno. Desde larva pediveliger a postlarva. Los datos se expresan en pg por día de cultivo.

	<i>Venerupis pullastra</i>		<i>Pecten maximus</i>
	Cultivo 2 Mejor Lv 15 Días Lv 22 Días	Cultivo 1 Bueno Lv 15 Días Lv 28 Días	Lv 19 Días Lv 23 Días
ng AGTs LP	20,641 Lv 15 días	8,333 Lv 15 días	4,932 Lv 19 días
ng AGTs LP	50,935 Postlv 22 días	15,631 Postlv 28 días	5,426 Postlv 23 días
Δ Total	4.328 pg	561 pg	124 pg
Ganancia AGTs	4.328 pg	562 pg	133 pg
Pérdida AGTs	---	-1 pg	-9 pg
Δ 16:0	784 pg (18,1%)	200 pg (35,6%)	9 pg (6,8%)
Δ EPA	255 pg (5,9%)	32 pg (5,7%)	-6 pg (-4,5%)
Δ 18:0	538 pg (12,4%)	107 pg (19,0%)	31 pg (23,3%)
Δ DHA	716 pg (16,5%)	55 pg (9,8%)	32 pg (24,1%)
Σ 4 AG (%)	52,9%	70,1%	49,7%
Δ 18:1(n-9)	224 pg (5,2%)	33 pg (5,9%)	1 pg (0,8%)
Δ 18:1(n-7)	206 pg (4,8%)	8 pg (1,4%)	6 pg (4,5%)
Δ 18:2(n-6)			16 pg (12,0%)
Δ 20:2(n-6)	144 pg/día (3,3%)	7 pg/día (1,2%)	
Δ 20:4(n-6)	206 pg (4,8%)	8 pg (1,4%)	1 pg (0,8%)
Δ 21:5(n-3)	234 pg (5,4%)	10 pg (1,8%)	-1 pg (-0,8%)
Δ 22:5(n-6)	179 pg (4,1%)	14 pg (2,5%)	6 pg (4,5%)
Σ 6 AG (%)	27,6%	14,2%	21,8%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XXIX: Evolución de los ácidos grasos en lípidos de reserva (LN) para las dos especies en presencia de alimento exógeno. Desde larva pediveliger a postlarva. Los datos se expresan en pg por día de cultivo.

	<i>Venerupis pullastra</i>		<i>Pecten maximus</i>
	Cultivo 2 Mejor Lv 15 Días Lv 22 Días	Cultivo 1 Bueno Lv 15 Días Lv 28 Días	Lv 19 Días Lv 23 Días
ng AGTs LN	14,385 Lv 15 días	5,555 Lv 15 días	15,648 Lv 19 días
ng AGTs LN	23,293 Postlv 22 días	13,141 Postlv 28 días	16,102 Postlv 23 días
Δ Total	1.273 pg	584 pg	114 pg
Ganancia AGTs	1.316 pg	592 pg	189 pg
Pérdida AGTs	-43 pg (-3,3%)	-8 pg (-1,4%)	-75 pg (-39,8%)
Δ 14:0		32 pg (5,4%)	-23 pg (-12,2%)
Δ 16:0	91 pg (6,9%)	59 pg (10,0%)	-47 pg (-25,0%)
Δ EPA	57 pg (4,3%)	39 pg (6,6%)	5 pg (2,7%)
Δ 18:0	89 pg (6,8%)	9 pg (1,5%)	-3 pg (-1,6%)
Δ DHA	251 pg (18,1%)	71 pg (12,0%)	1 pg (0,5%)
Σ 5 AG (%)	36,1%	35,5%	-35,6%
Δ 16:1(n-7)	-5 pg (-0,4%)	23 pg (3,9%)	27 pg (14,4%)
Δ 18:1(n-9)	10 pg (0,8%)	60 pg (10,2%)	8 pg (4,3%)
Δ 18:1(n-7)	22 pg (1,7%)	51 pg (8,6%)	19 pg (10,1%)
Σ 3 AG (%)	2,1%	22,7%	28,8%
Δ 18:2(n-6)	61 pg (4,6%)	35 pg (5,9%)	57 pg (30,2%)
Δ 21:5(n-3)	114 pg (8,7%)	6 pg (1,0%)	
Δ 18:3(n-3)			27 pg (14,4%)
Δ 22:5(n-3)	199 pg (15,1%)	2 pg (0,3%)	2 pg (1,1%)
Δ 22:5(n-6)	50 pg (3,9%)	8 pg (1,4%)	4 pg (2,1%)
Σ 4 AG (%)	32,3%	8,6%	47,8%

Nuestros resultados en el cultivo mejor indican que, la tasa de crecimiento dobla a la obtenida en la fase anterior (4.328 pg/día frente a 2.244 pg/día).

Para el cultivo bueno, la tasa de crecimiento es sensiblemente inferior (561 pg/día) aunque similar a la obtenida en la fase anterior (673 pg/día).

Una limitación de ambos en el alimento y fundamentalmente del DHA podría ser la causa de esta menor tasa de crecimiento en materia orgánica, así como al retardo en el crecimiento ya acumulado en el cultivo bueno.

El crecimiento en talla en el cultivo mejor es de 29,6 μm /día, mientras que en el bueno es de 22,7 μm / día.

Sin embargo en peso seco el cultivo mejor se incrementa a razón de 1.009 ng/día, por sólo 625 ng/día el cultivo (1).

Esto conduce a obtener postlarvas con similar peso seco: 10,08 μg postlarva cultivo 2 y 9,75 μg postlarva cultivo 1 siendo las primeras, sólo un poco más pequeñas (461 μm frente a 534 μm) y a pesar de llevar casi la mitad de vida postlarvaria que las segundas (7 días frente a 13 días).

2.4.3.1.- Estrategia en almeja babosa (Venerupis pullastra)

Para la almeja babosa los 4 los ácidos grasos de membrana que más se incrementan son:

- 16:0
- DHA
- 18:0
- EPA

Estos 4 ácidos representan, en los dos cultivos de almeja, el 53 y el 70 % del total de ácidos grasos incorporados en las membranas de post-larvas. En el cultivo 2 hay una tasa de incorporación similar para el 16:0 y el DHA pero en el cultivo 1, los saturados contribuyen más que los PUFAs (DHA y EPA).

Los datos en la evolución de los ácidos grasos en lípidos neutros (reservas) muestran que en el cultivo mejor hay una ganancia en AGTs de 1.273 pg/día (similar a la observada en la fase anterior 1.043 pg/día). En el cultivo bueno la ganancia en AGTs es de aproximadamente la mitad (584 pg/día), un poco superior a la obtenida en la fase anterior (378 pg/día).

Como aspectos más destacables, indicar que en los cultivos buenos los AGTs almacenados en los lípidos neutros siguen acumulándose, a pesar de gastarse como combustibles y como sillares estructurales.

El cultivo que mejor evoluciona es aquel que en sus reservas neutras almacena más DHA, tanto cuantitativamente (251 pg/día frente a 71 pg/día) como porcentualmente (16,5 % frente al 9,8 % del total de los AGTs acumulados).

2.4.3.2.- Estrategia en la vieira (*Pecten maximus*)

La vieira vuelve a tener un comportamiento diferente de la almeja babosa en este estadio. Mientas *V. pullastra* incrementa sus AGTs de membrana por un factor de 2,5 en el cultivo mejor y 1,9 en el cultivo bueno, *P. maximus* lo hace sólo en 1,1. Esto lleva a que el incremento en AGTs de membrana sea muy bajo, 124 pg/día, representando el 18:0 y el DHA el 47,4 % del total de AGTs incorporados en membrana.

El 16:0 y EPA sufren un incremento pequeño (16:0, un 6,8 % de los AGTs incorporados), o incluso desciende su contenido (EPA, -4,5 %).

El EPA, como hemos indicado anteriormente, se emplea como fuente energética (2º combustible) en estados de ayuno o cuando hay un gran

requerimiento de energía que soporte los procesos de biotransformación que tienen lugar durante la metamorfosis, período además, de no alimentación.

Los datos de lípidos neutros en la vieira muestran una pérdida considerable en el contenido de AGTs en dicha fracción, siendo soportado este descenso exclusivamente por la fracción de los SAFAs (14:0, 16:0 y 18:0) que representan un 38,8 % de la ganancia total.

Esto, junto con el pequeño incremento en EPA en lípidos neutros, 2,5 % de la ganancia total de ácidos grasos e incluso, el descenso de EPA en lípidos polares de un 4,5 % del total ganado, indican el uso preferente de estos como combustibles energéticos que soporten las complejas biotransformaciones en la metamorfosis de la vieira.

También cabe resaltar el acúmulo de EFAs [18:2(n-6) y 18:3(n-3)] en lípidos neutros, totalizando el 44,6 % de los ácidos grasos ganados. Esto nos informa de un buen estado en las reservas de ácidos grasos precursores de las series $\omega 3$ y $\omega 6$, estando cubiertas sus necesidades para la construcción de sillares estructurales de fosfolípidos de membrana.

Comparando los resultados con almeja, podemos indicar que el paso de larva a postlarva en almeja, vuelve a ser más rápido y menos complejo que en la vieira.

Todo esto se traduce en que la almeja babosa, de nuevo prioriza el crecimiento y desarrollo rápido, a almacenar reservas lipídicas neutras.

Así a día 22 en el cultivo mejor de la almeja babosa tenemos semillas (postlarvas) de 461 μm de tamaño (OL) con un peso seco de 10,08 μg /postlarva y un contenido en AGTs de 50,9 ng/postlarva en lípidos polares (estructuras) y 23,3 ng/postlarva en lípidos neutros (reservas).

$$\text{Relación AGTs LP / AGTs LN} = 2:1$$

A día 23, en el cultivo de la vieira tenemos postlarvas de aproximadamente 215 µm de tamaño (OL) con un contenido en AGTs de 5,4 ng/postlarva en estructuras y 16,1 ng/postlarva en reservas.

Relación AGTs LP / AGTs LN = 1:3

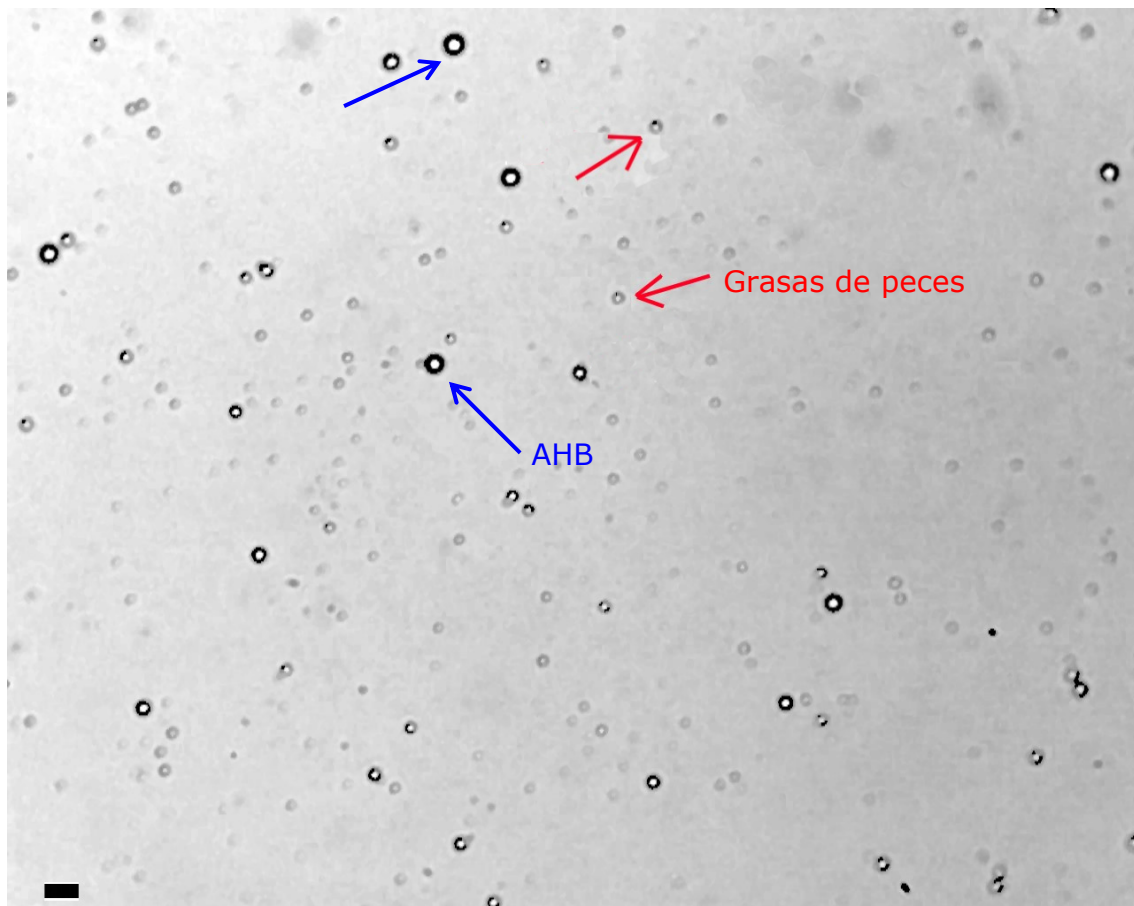
3.- EXPERIENCIAS CON LAS MICROCÁPSULAS

3.1.- In Vitro

1.- PARA CONFIRMAR DATOS SOBRE FABRICACIÓN Y ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LAS MICROCÁPSULAS

➤ MICROCÁPSULAS CON DISTINTAS GRASAS Y ACEITES

El tamaño de estas microcápsulas está comprendido entre 4 y 5 μm de diámetro para las fabricadas a partir de las grasas de peces (atún, caballa y sardina) y de 8,5 μm para las obtenidas a partir del aceite de hígado de bacalao (AHB).



Fotografía de las microcápsulas con las distintas grasas de pescado y del aceite de hígado de bacalao (AHB). Barras de escala 10 μm .

En la Figura 21 se representan los porcentajes de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las grasas de peces y del aceite de hígado de bacalao antes de su encapsulación.

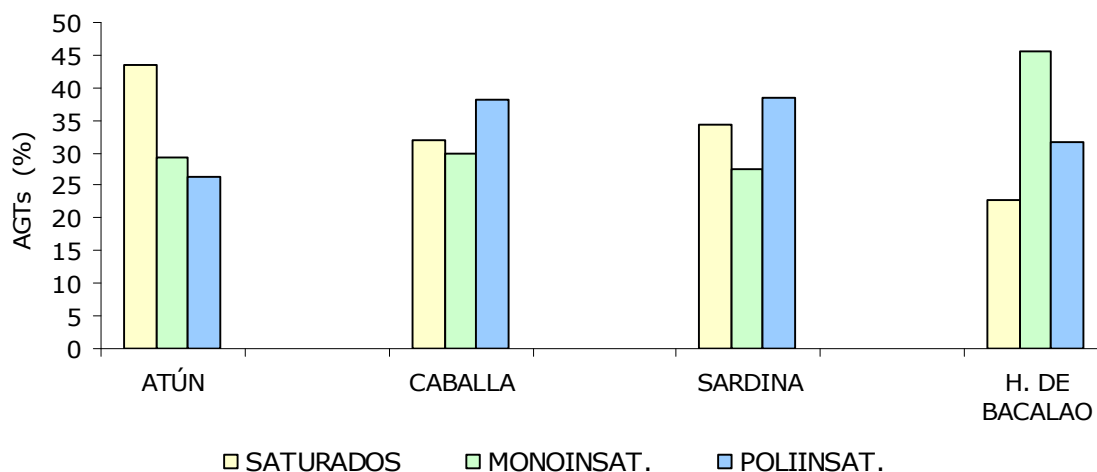


Fig. 21: Representación de los porcentajes para las familias de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en las grasas y del aceite de hígado de bacalao previa microencapsulación.

La grasa de atún es rica en ácidos grasos eminentemente energéticos representados por los saturados (43,6 %) y los monoinsaturados (29,2 %). Sin embargo es pobre en ácidos grasos estructurales, es decir poliinsaturados (26,2 %), siendo el ácido graso representativo de esta familia el DHA.

Las grasas de caballa y sardina son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (38,2 % y 38,5 %, respectivamente). La de caballa aporta fundamentalmente DHA y en menor medida EPA (relación 3:1), mientras que en la sardina, el EPA y el DHA son mayoritarios, encontrándose en una relación 2:1.

En cuanto al aceite de hígado de bacalao (AHB), es rico en MUFAs (45,6 %) y en PUFA (31,7 %), estando el EPA y el DHA en una relación 1:1 aproximadamente.

La Tabla XXX, muestra los datos de la composición en ácidos grasos para las grasas y el aceite, así como de las microcápsulas con ellas obtenidas.

Tabla XXX: Porcentaje de ácidos grasos de las grasas de peces y del aceite de hígado de bacalao (AHB) previa encapsulación y de las microcápsulas fabricadas. Los AGTs de las microcápsulas se expresan en pg/ μ cáp.

	(%)							
	Grasas de peces y AHB previa encapsulación				Microcápsulas			
	ATÚN	CABALLA	SARDINA	H. DE BACALAO	ATÚN	CABALLA	SARDINA	H. DE BACALAO
Ácidos grasos								
14:0	3,32	5,63	9,45	5,27	4,65	7,56	10,94	5,30
15:0	0,99	0,39	0,80	0,37	1,10	0,56	1,14	0,38
16:0	25,79	18,16	19,56	13,52	26,09	17,97	22,73	13,66
17:0	1,43	0,57	0,60	0,17	1,51	0,56	0,69	0,20
18:0	10,73	6,37	3,64	3,45	10,54	4,85	4,09	3,39
20:0	0,61	0,22	0,30		0,68	0,30	0,29	
22:0	0,29	0,58			0,44	0,22		
24:0	0,39				0,41			
16:1(n-9)	0,58	0,33	0,80	0,60	0,73	0,43	1,26	0,54
16:1(n-7)	5,97	2,89	10,88	9,19	5,85	2,91	10,32	8,74
18:1(n-9)	18,28	12,50	9,78	19,95	19,19	13,08	10,91	19,14
18:1(n-7)	3,19	2,86	3,43	5,25	3,21	2,45	3,33	5,32
20:1(n-9)	1,22	8,64	1,81	9,65	1,10	10,38	1,42	10,13
22:1(n-9)		1,09	0,27	0,65		1,25	0,25	0,72
24:1(n-9)		1,56	1,34	0,27		2,10	0,48	0,38
18:2(n-6)	1,73	2,19	1,17	1,64	2,13	2,10	1,71	2,01
18:3(n-3)	0,62	1,13	1,00	0,75	0,47	0,88	0,89	0,74
18:4(n-3)	0,48	1,65	2,99	2,30	0,71	1,89	2,93	2,28
20:2(n-6)	0,19	0,22		0,25	0,25	0,28		0,25
20:4(n-6)	2,30	0,84	0,88	0,33	1,94	0,62	0,77	0,38
20:4(n-3)	0,29	0,81	1,03		0,32	0,57	0,87	
20:5(n-3)	3,50	3,87	19,00	8,59	3,32	2,39	14,37	8,20
21:4(n-6)		12,62	0,75	6,83		18,36	0,50	7,35
22:5(n-6)	1,56	0,65			1,32	0,44		
22:5(n-3)	1,57	1,25	1,51	1,09	1,68	1,07	1,41	1,43
22:6(n-3)	13,99	12,96	10,17	9,93	11,56	7,24	8,51	9,93
Tot. (n-3)	20,45	21,67	35,70	22,66	18,06	14,04	28,98	22,58
Tot. (n-6)	5,78	16,52	2,80	9,05	5,64	21,80	2,98	9,99
(n-3)/(n-6)	3,54	1,31	12,75	2,50	3,20	0,64	9,72	2,26
SATURADOS	43,55	31,92	34,35	22,78	45,42	32,02	39,88	22,93
MONOINSAT.	29,24	29,87	27,51	45,56	30,91	32,60	27,97	44,97
POLIINSAT.	26,23	38,19	38,50	31,71	23,70	35,84	30,18	32,11
Tot. pg/μcáp					2,23	1,88	2,89	7,09

Los resultados obtenidos indican que las grasas y el aceite de partida presentan diferencias en la composición de los ácidos grasos con relación a la de las microcápsulas fabricadas.

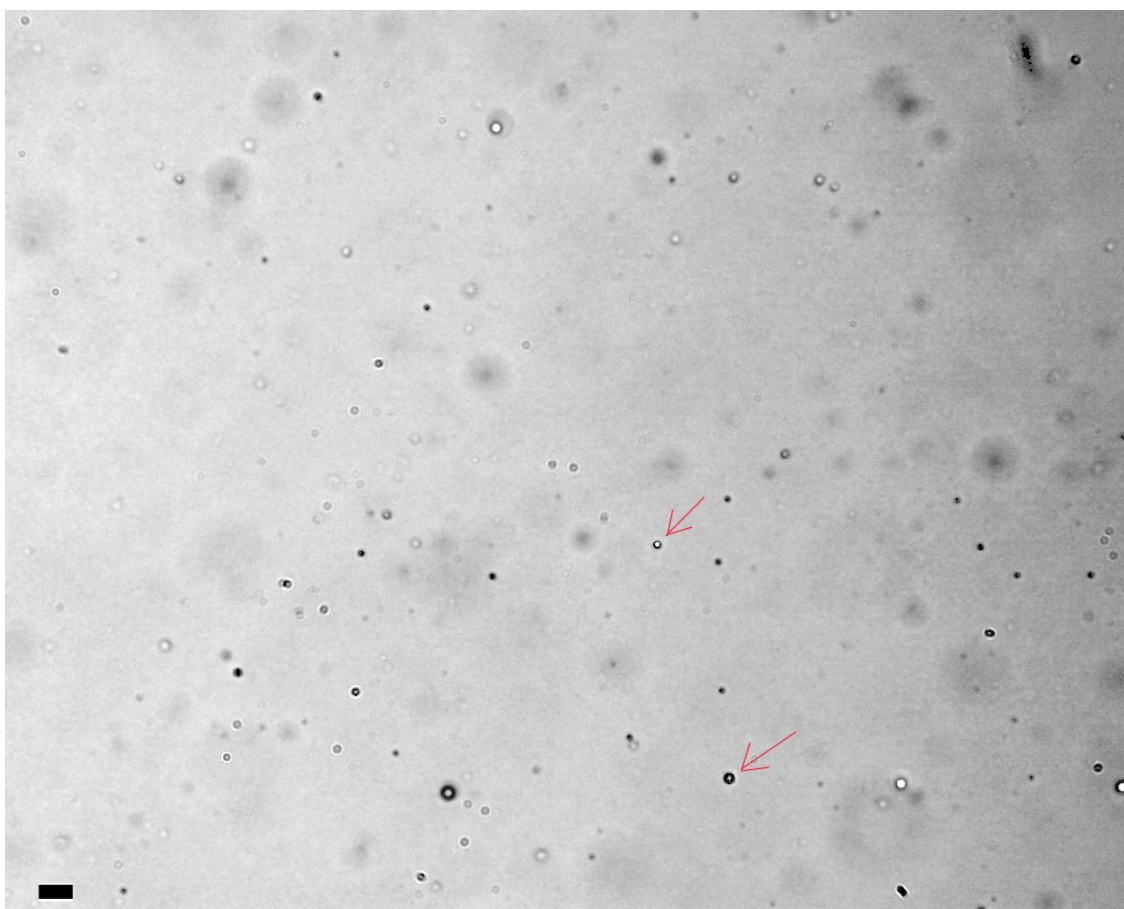
Se observa como la fabricación de las microcápsulas altera de forma bastante acusada, la composición en ácidos grasos de las grasas de peces, mientras que en el aceite de hígado de bacalao es menor.

En todas las grasas, después de su encapsulación, disminuye el porcentaje de PUFAs, sobretodo del DHA, EPA y ARA. La explicación a esta pérdida puede estar en que estos ácidos grasos son altamente sensibles a fenómenos de oxidación.

Las microcápsulas de gelatina-acacia pueden incorporar en su interior distintos aceites y grasas con diferente composición en ácidos grasos, aunque sufriendo algunas alteraciones en la fabricación dependiendo de las características del material a encapsular (Nóvoa y col., 1999).

➤ MICROCÁPSULAS CON ACEITE DE OLIVA Y *AA

Las microcápsulas con aceite de oliva y ácido araquidónico deuterado (*AA) fabricadas en el año 2002 van a tener un tamaño de 3 μm . El diámetro de las micropartículas obtenidas en este lote, no difiere demasiado con los datos de tamaño expuestos en la publicación presentada en el Apéndice (3,5 μm).



*Fotografía de las microcápsulas con aceite de oliva y *AA. Barras de escala 10 μm .*

En la Tabla XXXI se muestran los datos de composición porcentual en ácidos grasos del aceite de oliva utilizado para la fabricación de las micropartículas y los porcentajes de ácidos grasos encontrados en éstas últimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XXXI: Composición en ácidos grasos del aceite de oliva y de las microcápsulas (porcentajes y pg/ μ cáp). Los datos se corresponden a la media, siendo $n=3$.

Ác. Grasos	ACEITE DE OLIVA		MICROCÁPSULAS			
	%		%		pg/ μ cáp	
	Media	Std	Media	Std	Media	Std
14:0	0,18	0,04				
16:0	11,19	0,05	11,6	0,5	0,136	0,006
18:0	2,77	0,08	2,7	0,2	0,031	0,002
16:1(n-7)	1,23	0,11				
18:1(n-9)	68,75	0,35	66,8	3,2	0,780	0,037
18:1(n-7)	2,56	0,21	2,5	0,1	0,029	0,002
20:1(n-11)						
20:1(n-9)	0,43	0,01				
20:1(n-7)						
18:2(n-6)	10,77	0,12	10,7	0,5	0,125	0,006
18:2(n-4)						
18:3(n-6)						
18:3(n-3)	2,14	0,12	0,8	0,0	0,010	0,001
18:4(n-3)						
20:2(n-6)						
20:3(n-6)						
20:4(N-6)-d₈			4,8	0,4	0,057	0,004
20:4(n-6)						
20:4(n-3)						
20:5(n-3)						
21:4(n-6)						
21:5(n-3)						
22:4(n-6)						
22:5(n-6)						
22:5(n-3)						
22:6(n-3)						
SATURADOS	14,13	0,19	14,3	0,7	0,167	0,008
MONOINSAT.	72,96	0,09	69,3	3,3	0,809	0,039
POLIINSAT.	12,91	0,21	16,3	0,8	0,191	0,009
Tot. (n-3)	2,14	0,12	0,83	0,0	0,010	0,001
Tot. (n-6)	10,77	0,12	15,51	0,7	0,181	0,009
(n-3)/(n-6)	0,20		0,05		0,054	
Tot. pg/μcáp					1,17	0,06

Los análisis demuestran que en su fabricación se consigue obtener 1,17 pg totales por microcápsula.

Observamos como los ácidos grasos monoinsaturados son los más abundantes en el aceite de oliva (72,96 %), lo que provoca que también lo sean en las micropartículas fabricadas (69,3 %). Estos altos porcentajes se deben sobretodo al gran contenido en 18:1(n-9) (68,75 % y 66,8 %, respectivamente).

Los SAFAs, 14,13 % en el aceite de oliva y 14,3 % en las microcápsulas están representados mayoritariamente por el 16:0 (11,11 % y 11,6 %) y 18:0 (2,8 % y 2,7 % en ambos casos).

En los poliinsaturados, 12,9 % en el aceite y 16,3 % en las microcápsulas, destaca el 18:2(n-6) (10,77 % y 10,7 %, respectivamente) y el *AA (4,8 % en las microcápsulas).

Los porcentajes de los ácidos grasos del aceite de oliva, se conservan después del proceso de microencapsulación.

Estas microcápsulas son muy parecidas a las que ya obtuvimos en un lote anterior (publicación Apéndice), por lo tanto existe repetibilidad y en consecuencia, eficacia en su fabricación.

El tamaño es algo menor y su contenido total en ácidos grasos también 1,2 frente a 3,8 pg/μcáp, sin embargo los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios a los que se les realiza el seguimiento es muy semejante.

El 18:1(n-9) está en un 66,8 % en estas nuevas micropartículas y en las anteriores era de un 65,8 %. Por otra parte, aquí tenemos un 4,8 % de *AA valor sensiblemente más bajo al conseguido con las primeras *AA-GAM (5,4 %).

A estas microcápsulas se les hizo un seguimiento a lo largo de 21 días de almacenamiento. En la Tabla XXXII se muestran los datos porcentuales de los ácidos grasos de las microcápsulas así como su cantidad total (pg/μcáp) a día 0, día 7 y día 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XXXII: Composición porcentual en ácidos grasos de las microcápsulas con aceite de oliva y ácido araquidónico deuterado, al día 0 de la fabricación y a los 7-21 días de almacenamiento. También se da la cantidad total de AGTs (pg/ μ cáp). Los datos se corresponden a la media, siendo $n=3$.

Ác. Grasos	0		7		21	
	Media	Std	Media	Std	Media	Std
14:0						
16:0	11,65	0,006	11,60	0,007	12,17	0,008
18:0	2,70	0,002	2,66	0,001	3,34	0,002
16:1(n-7)						
18:1(n-9)	66,83	0,037	65,71	0,028	65,01	0,046
18:1(n-7)	2,48	0,002	2,38	0,001	2,66	0,002
20:1(n-11)						
20:1(n-9)						
20:1(n-7)						
18:2(n-6)	10,67	0,006	10,32	0,004	10,39	0,007
18:2(n-4)						
18:3(n-6)						
18:3(n-3)	0,83	0,001	0,78	0,000	1,13	0,000
18:4(n-3)						
20:2(n-6)						
20:3(n-6)						
20:4(N-6)-d₈	4,84	0,004	6,55	0,002	5,30	0,002
20:4(n-6)						
20:4(n-3)						
20:5(n-3)						
21:4(n-6)						
21:5(n-3)						
22:4(n-6)						
22:5(n-6)						
22:5(n-3)						
22:6(n-3)						
SATURADOS	14,34	0,008	14,26	0,008	15,51	0,010
MONOINSAT.	69,31	0,039	68,09	0,029	67,67	0,049
POLIINSAT.	16,35	0,009	17,65	0,007	16,82	0,009
Tot. (n-3)	0,83	0,001	0,78	0,000	1,13	0,000
Tot. (n-6)	15,51	0,009	16,86	0,006	15,69	0,009
(n-3)/(n-6)	0,054		0,046		0,072	
Tot. pg/μcáp	1,17	0,055	1,21	0,044	1,05	0,066

Las diferencias encontradas en los porcentajes de ácidos grasos y en la cantidad total, a lo largo de su almacenamiento, son debidas al error en la manipulación de las muestras al realizar los análisis (10 %) expuesto en el capítulo de Material y Métodos.

En este estudio dejamos claro la eficacia del almacenamiento, al no existir pérdidas considerables a lo largo de los 21 días de seguimiento.

2.- PARA CONFIRMAR INGESTIÓN Y DIGESTIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS

➤ MICROCÁPSULAS CON COLORANTE DE CUBIERTA

Para corroborar que las microcápsulas fueron ingeridas y digeridas por las larvas, se hicieron microcápsulas con colorante de cubierta (FITC) y se observaron con microscopio fluorescente (Nóvoa y col., 2002).

En la fotografía de la Figura 22 se comprueba la ingestión de las GAM al observar el acúmulo de la fluorescencia (color amarillo) dentro de la larva.

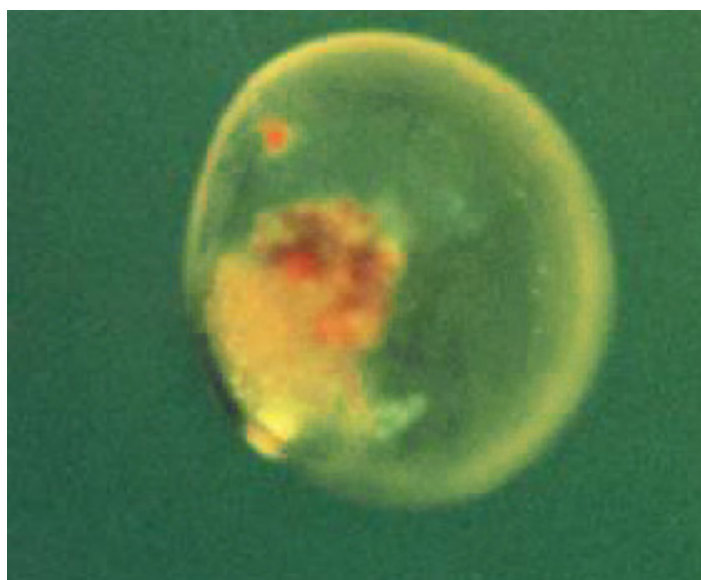


Fig. 22: Larva de Venerupis pullastra después de ser alimentada con microcápsulas con colorante de cubierta (FITC) y observada con microscopio fluorescente. Foto de J.L. Rodríguez.

En la Figura 23 se muestra una secuencia de imágenes donde se ve en un primer momento, una fluorescencia (color verdoso) que demuestra su acúmulo o ingestión y que posteriormente dicha fluorescencia desaparece, confirmando que están siendo digeridas.

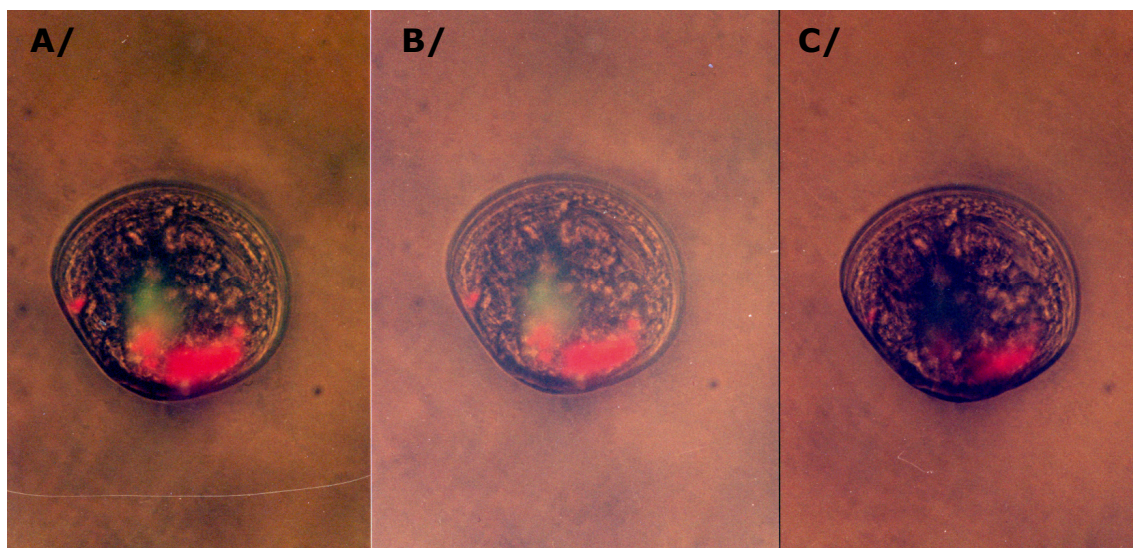


Fig. 23: Serie de fotografías (A-C) obtenidas con microscopio de fluorescencia a lo largo de un período de 20 minutos. Se observa la desaparición del color verde fluorescente. Foto de J.L. Rodríguez.

Con estos resultados, expuestos en la publicación realizada por nuestro equipo (Apéndice), podemos afirmar que existe ingestión y digestión de las microcápsulas de gelatina-acacia por parte de las larvas de almeja babosa.

3.2.- In Vivo

1.- PARA CONFIRMAR LA ASIMILACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS POR LAS LARVAS

➤ EXPERIENCIA RÁPIDA CON MICROCÁPSULAS FABRICADAS EN EL AÑO 2000 (Publicación Apéndice)

En este trabajo queda demostrada la incorporación en las larvas alimentadas exclusivamente con *AAGAM, del 20:4(n-6)-d₈ en las frac-

ciones de lípidos polares y neutros (0,10 y 0,12 ng/larva, respectivamente).

La cantidad del ácido graso principal en el aceite de oliva, 18:1 (n-9), también aumenta en los lípidos neutros y polares cuando se compara las larvas en ayuno: 1,08 ng/larva frente a 0,33 en lípidos neutros y 0,66 ng/larva frente 0,28 en lípidos polares.

Los porcentajes de incorporación del 20:4(n-6)-d₈ son casi iguales en ambas fracciones de lípidos, el 4,30 % para los lípidos polares y 4,80 % para los lípidos neutros, mientras que para el 18:1 (n-9) observamos una acumulación selectiva en la fracción neutra (2,53 %), siendo menor el transvase a lípidos polares (1,31 %).

Con estos datos podemos decir que, la asimilación de los ácidos grasos aportados por las microcápsulas se verifica a dos niveles:

1.- En primer lugar por el aporte de un ácido graso exógeno que no se encuentra en el organismo por estar formulado en su forma deuterada [20:4(n-6)-d₈]. Su presencia en el organismo al ser detectado mediante cromatografía de gases, puesto que es claramente distinguible de la forma no deuterada por sus diferentes tiempos de retención, nos informa de su asimilación, tanto en reservas (fracción lípidos neutros), como en membranas (fracción lípidos polares)

2.- En segundo lugar obtenemos incrementos importantes del ácido graso mayoritario aportado en las microcápsulas [18:1(n-9)] que sí está presente de forma natural en el organismo. Esto se demuestra por los aumentos en el contenido del ácido oleico, sobretodo en la fracción de lípidos neutros, de las larvas alimentadas con *AAGAM, frente a las sometidas a ayuno

Observamos diferencias en las tasas de asimilación tanto a nivel de las fracciones lipídicas (de reserva y de membrana), como a nivel del ácido graso aportado, lo que parece sugerir una asimilación dependiente del tipo

de ácido graso. El ácido araquidónico se asimila de forma equivalente en ambas fracciones, mientras que el oleico se acumula preferencialmente en la fracción neutra.

Por otra parte para explicar estas diferencias, sí juega un papel importante la cantidad aportada de cada ácido graso por microcápsula puesto que, cuanta más cantidad se aporta por larva, mayor es la tendencia a almacenarla en lípidos neutros (es el caso del ácido oleico).

➤ EXPERIENCIA DE 24 HORAS CON MICROCÁPSULAS FABRICADAS EN EL AÑO 2002

Para reafirmar que los ácidos grasos encapsulados son asimilados por las larvas, se realiza ésta experiencia en condiciones más reales de cultivo y en la que la alimentación dura más tiempo.

La dieta aplicada está reflejada en la Tabla XXXIII donde se muestran los contenidos de ácidos grasos (ng por larva).

A cada individuo de la experiencia se le proporcionaron 13,19 ng de ácidos grasos totales, de los cuales 8,82 ng son de 18:1(n-9) y 0,64 ng de 20:4(n-6)d₈.

En este caso la cantidad total de ácidos grasos de la dieta aportada por las microcápsulas es mucho menor que en la experiencia anterior (45,4 ng por larva), esto es debido fundamentalmente, a que en este nuevo estudio, la prueba realizada intenta ajustarse a una situación real del cultivo de la almeja babosa por lo que, la cantidad de ácidos grasos aportados es disminuida para adaptarse a éstas condiciones reales.

En consecuencia, la cantidad de 18:1(n-9) y de 20:4(n-6)-d₈ aportado por larva también es menor, pero la proporción entre ambos se respeta, siendo el porcentaje del primero bastante mayor en las dos experiencias.

Tabla XXXIII: Composición en ácidos grasos de la dieta (60 equivalentes de microcápsulas con aceite de oliva y ácido araquidónico deuterado) expresado en ng por larva. Composición en ácidos grasos en las fracciones de lípidos polares y neutros de las larvas sometidas a ayuno y a la dieta con microcápsulas (ng/larva). Los datos se corresponden a la media, siendo n=3.

	ng/larva									
	LT		LP				LN			
	Dieta:		Larvas		Larvas		Larvas		Larvas	
	*AA-GAM		Ayuno		*AA-GAM		Ayuno		*AA-GAM	
Ác. Grasos	Media	Std	Media	Std	Media	Std	Media	Std	Media	Std
16:0	1,54	0,07	1,76	0,23	1,32	0,17	1,10	0,08	1,84	0,23
18:0	0,36	0,02	0,78	0,03	0,70	0,03	0,39	0,05	0,58	0,04
18:1(n-9)	8,82	0,42	0,45	0,05	0,65	0,01	0,71	0,04	3,37	0,32
18:1(n-7)	0,33	0,02	0,47	0,08	0,33	0,02	0,42	0,02	0,69	0,08
20:1(n-9)	0,00	0,00	0,26	0,03	0,19	0,02	0,12	0,00	0,20	0,01
18:2(n-6)	1,41	0,07	0,13	0,01	0,14	0,00	0,41	0,05	0,71	0,02
18:3(n-3)	0,11	0,01	0,32	0,04	0,31	0,03	0,22	0,02	0,32	0,05
20:4(N-6)-d₈	0,64	0,05	0,00	0,00	0,06	0,01	0,00	0,00	0,12	0,02
20:4(N-6)	0,00	0,00	0,16	0,02	0,10	0,01	0,07	0,00	0,10	0,01
20:5(n-3)	0,00	0,00	0,27	0,04	0,20	0,02	0,16	0,00	0,26	0,03
22:6(n-3)	0,00	0,00	1,99	0,14	1,51	0,09	0,37	0,01	0,59	0,10
SATURADOS	1,89	0,09	3,84	0,35	2,14	0,24	2,02	0,11	3,05	0,36
MONOINSAT.	9,14	0,44	1,28	0,15	1,49	0,09	1,66	0,07	5,71	0,81
POLIINSAT.	2,16	0,10	5,19	0,48	4,50	0,16	2,26	0,11	3,43	0,00
Tot. (n-3)	0,11	0,01	3,11	0,19	2,42	0,56	1,29	0,01	1,90	0,06
Tot. (n-6)	2,05	0,10	1,15	0,18	0,88	0,17	0,75	0,08	1,24	0,04
(n-3)/(n-6)	0,05		2,70		2,74		1,73		1,53	
Tot. ng/larva	13,2	0,6	11,7	0,8	8,9	0,4	6,0	0,3	12,4	1,8

En esta Tabla también se exponen los datos de la composición en ácidos grasos de las larvas sometidas a ayuno y las expuestas a la dieta con microcápsulas en las fracciones de lípidos polares y neutros.

Vemos claramente la asimilación del *AA en las larvas que comieron las microcápsulas frente a las que estuvieron en ayuno (0,062 ng/larva en LP y 0,117 ng/larva en LN).

El ácido oleico del aceite de oliva también es asimilado tanto en la fracción polar como neutra, puesto que tenemos valores de 0,45 ng/larva y

0,71 ng/larva, respectivamente en los individuos que no comieron, frente a 0,65 ng/larva y 3,37 ng/larva en los que comieron las micropartículas.

De igual forma, en los restantes ácidos grasos aportados y en el total, se detectan asimilaciones en ésta fracción de lípidos de reserva.

La tasa de incorporación de los ácidos grasos estudiados, expresada en porcentaje, se representa en la Figura 24. La fórmula para calcular este parámetro es la siguiente:

$$\text{Tasa de incorporación } AG_x (\%) = \frac{(*AAGAM-Ayuno)_{larvas} \text{ ng } AG_x \text{ larva}^{-1}}{(*AAGAM-Ayuno)_{dieta} \text{ ng } AG_x \text{ larva}^{-1}} \times 100$$

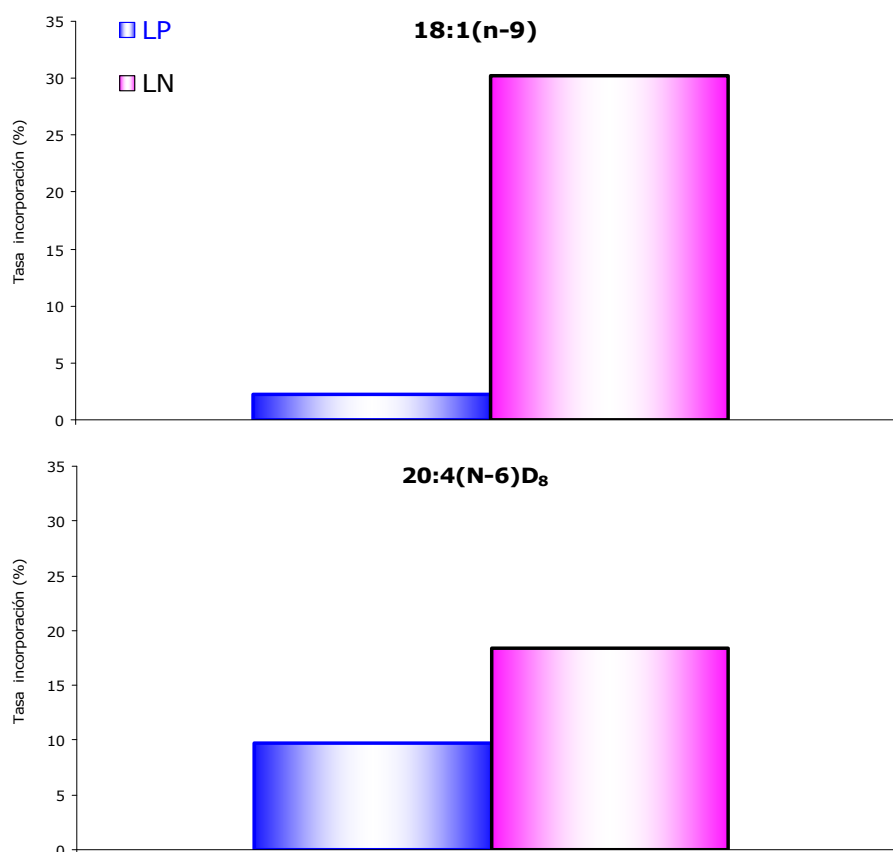


Fig. 24: Tasas de incorporación (%) de los principales ácidos grasos asimilados en las fracciones de lípidos polares y neutros, por parte de las larvas de almeja babosa alimentadas con microcápsulas con aceite de oliva y *AA.

Los principales ácidos grasos aportados en las microcápsulas fabricadas nuevamente son incorporados por las larvas, tanto en la fracción de lípidos polares como neutros, pero en estos últimos, parece que de una forma más acusada.

El porcentaje de incorporación para el 18:1 (n-9) es de 2,3 % para lípidos polares y de 30,2 % para los neutros. En el caso del *AA, las tasas son de 9,7 y 18,3, respectivamente.

Las diferencias son más claras entre las dos fracciones en esta nueva prueba. La posible causa puede ser que las experiencias son distintas, sobretodo en el tiempo de exposición a las microcápsulas (24 horas frente a 12 horas). Diferencia que se acentúa, dado que las larvas que se alimentaron sólo durante 12 horas, también sufrieron otras 12 horas de ayuno antes de ser recogidas para su análisis.

En cualquier caso, los resultados de todas estas experiencias realizadas con microcápsulas, permiten confirmar la viabilidad del empleo de un alimento artificial en los cultivos de desarrollos larvarios de bivalvos marinos, al comprobarse la ingestión, digestión y asimilación del alimento aportado en las microcápsulas.

2.- ENSAYOS COMO SUPLEMENTACIÓN NUTRICIONAL

Por todo lo visto, las microcápsulas van a permitir incorporar, de forma específica, aquellas sustancias que van a estar ausentes o presentes, pero en bajas cantidades, en una alimentación habitual basada en microalgas.

Resta estudiar el comportamiento de las larvas de la almeja babosa expuestas a la incorporación en su dieta de las GAM, fabricadas con distintos componentes lipídicos.

➤ SEGUIMIENTO DE TASAS DE CRECIMIENTO Y MORTALIDAD DE UN DESARROLLO LARVARIO CON DIETAS DE MICROALGAS Y MIXTA

Se utilizan las mismas microcápsulas fabricadas con las distintas grasas de peces (atún, caballa y sardina) y de aceite de hígado de bacalao.

Al realizar el seguimiento del cultivo durante 10 días, por una parte encontramos que las mortalidades en todos los casos no presentan porcentajes relevantes (9-14 %), en consecuencia, parece que las microcápsulas no son nocivas para las larvas.

De todas formas observamos que las menores mortalidades las presentan las larvas que fueron alimentadas con GAM de grasa de atún y caballa (9 %) frente a las alimentadas con GAM de aceite de hígado de bacalao (14 %).

Esto puede deberse a que las primeras son más pequeñas e incorporan menos cantidad de lípidos (2,23 pg/μcap y 1,88 pg/μcap, respectivamente) frente a los 7,09 pg/μcáp de las AHB. Por otra parte, éstas últimas tienen un tamaño bastante mayor (8,5 μm frente 5 μm).

Consecuentemente las GAMs no son tóxicas para las larvas puesto que no existen mortalidades exageradas pero, es mejor obtener micropartículas más pequeñas y con menor contenido lipídico.

En la Figura 25 se representan los datos de los distintos crecimientos en longitud de las larvas sometidas a una alimentación con fitoplancton y las sometidas a una dieta con las microcápsulas, que incorporaban distintas grasas (atún, caballa y sardina) y el aceite de hígado de bacalao (AHB).

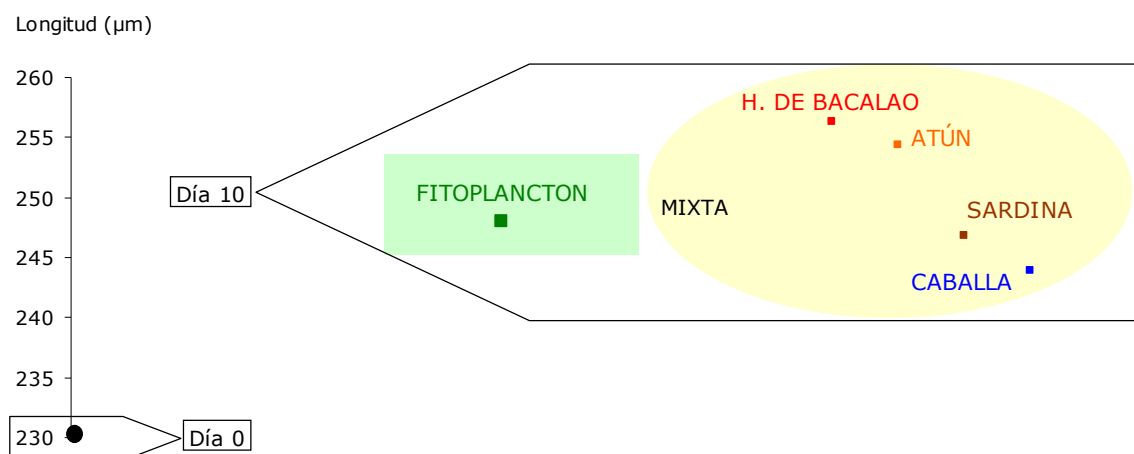


Fig. 25: Representación de los crecimientos alcanzados por las larvas sometidas a la alimentación con fitoplancton (control) y con dieta mixta con fitoplancton y microcápsulas de distinta composición lipídica, al cabo de diez días (datos en µm). Los datos se corresponden a la media (n=100).

Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba ANOVA, que determina si existen diferencias significativas entre los datos (n=100) de los crecimientos obtenidos al final de la prueba (10 días). Se compararon los tamaños en longitud de las conchas de las larvas alimentadas con la dieta basada solamente en fitoplancton (control) y las dietas mixtas (fitoplancton + microcápsulas con distintas grasas y AHB). Se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows versión 13.0®.

El resultado de este estudio se muestra en la Tabla XXXIV, donde se exponen los resultados de las medias de los datos (n=100) y su desviación típica. La comparación del cultivo control (fitoplancton) con los otros cuatro alimentados con dieta mixta, nos da unos datos de significación que también exponemos en esta Tabla.

Tabla XXXIV: Estudio estadístico de las diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$).

	N	Media	Desviación Típica	Significación	
Fitoplancton	100	247,99	19,8		
μcáp. Caballa	100	243,93	16,6	Fitoplancton	μcáp. Caballa 0,110
μcáp. Atún	100	254,38	16,5		μcáp. Atún* 0,012
μcáp. Sardina	100	246,89	16,3		μcáp. Sardina 0,664
μcáp. Bacalao	100	256,34	19,9		μcáp. Bacalao* 0,001

Según este análisis, partiendo de larvas de $230 \pm 20,3 \mu\text{m}$ y poniendo como control a la dieta basada en fitoplancton, existen diferencias significativas al 95 % de confianza con las dietas aplicadas de microcápsulas de atún y, sobretodo de hígado de bacalao. Se obtienen datos finales de $254 \pm 16,5$ y $256 \pm 19,9 \mu\text{m}$, respectivamente frente a las $248 \pm 19,8 \mu\text{m}$ del fitoplancton.

Por lo tanto pueden ser aportadas como suplemento alimenticio variando su contenido lipídico dependiendo de las demandas que, como acabamos de ver en el apartado de las evoluciones en ácidos grasos, varían según las transformaciones que tienen lugar a lo largo de los desarrollos larvarios de las distintas especies de bivalvos a cultivar. Quedan así confirmados otros estudios nutricionales anteriores con bivalvos marinos (Chu y col., 1982, 1987; Southgate, 1988; Numaguchi y Nell, 1991; Knauer y Southgate, 1997a, 1997b).

Durante los períodos en los que se requiera un alto gasto energético, serían adecuadas las microcápsulas que aportan SAFAs y MUFAs.

En las especies y en las fases cuya estrategia principal sea la creación de nuevas membranas y la reestructuración de órganos y tejidos, se requerirán microcápsulas que aporten mayoritariamente PUFA de la serie (n-3), cuyo papel primordial es el de formación de membranas celulares (Sargent y col., 1995).

En cualquier caso, según lo visto en los anteriores apartados, en las microcápsulas suministradas a la dieta debería de haber una relación equilibrada (1:1) entre SAFAs y PUFAs o en todo caso, una cantidad mayor de ácidos grasos saturados, concretamente del 16:0.

De igual forma un aporte excesivo de PUFAs (n-3) que altere la relación $\omega 3/\omega 6$, podría tener un efecto negativo ya que, podrían inhibirse y retardarse los procesos lipogénicos responsables de la formación de biomembranas, tal como se indica en la Introducción (Clarke, 2001).

3.- ENSAYOS COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO

Existe además la posibilidad de realizar estudios sobre estrategias metabólicas de ácidos grasos y otros compuestos esenciales para obtener un buen desarrollo larvario, un buen crecimiento o un efectivo acondicionamiento de progenitores en los criaderos.

➤ SEGUIMIENTO METABÓLICO DEL ÁCIDO OLEICO Y ÁCIDO ARAQUIDÓNICO DEUTERADO CON *AAGAMs (Publicación Apéndice)

La primera prueba de este tipo se hace con *AAGAM fabricadas en el año 2000, con las que se estudia el comportamiento del ácido oleico y araquidónico deuterado, a lo largo de 7 días de cultivo (Apéndice).

Con este ensayo podemos hacer un seguimiento, a lo largo del tiempo y en las fracciones de lípidos neutros y polares, de estos dos ácidos grasos aportados de forma mayoritaria con las GAM y compararlo con el seguido por las larvas, que sólo fueron alimentadas con la dieta microalgal (Figura 26).

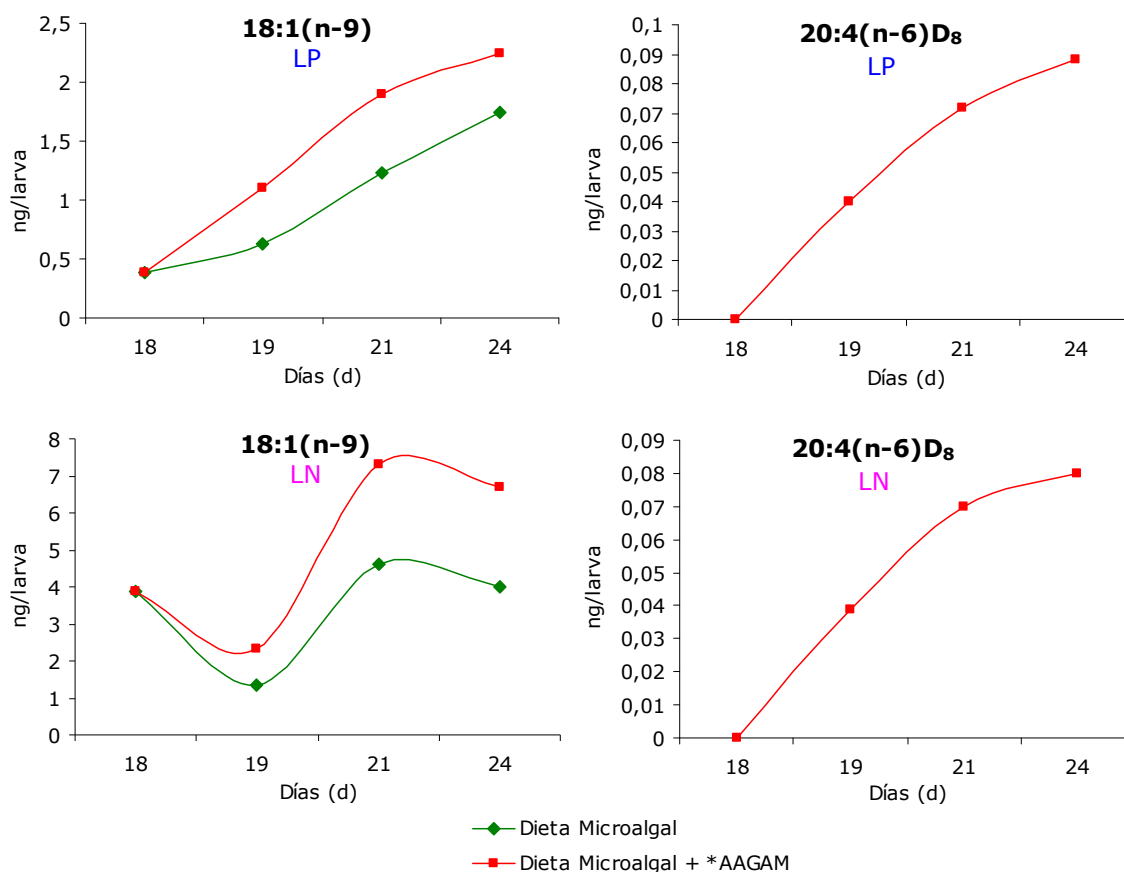


Fig. 26: Seguimiento del 18:1(n-9) y del 20:4(n-6)-d₈ en las fracciones de lípidos neutros y polares de las larvas alimentadas con dieta microalgal y dieta mixta (microalgas + *AAGAM) a lo largo de los 7 días que dura la experiencia. Los datos se expresan en ng/larva.

Como se observa, las larvas que fueron alimentadas con una dieta suplementada con *AAGAM, muestran un aumento mayor en la incorporación del 18:1(n-9) frente a las que fueron alimentadas con la dieta microalgal. Por otra parte, se vuelve a confirmar la asimilación del 20:4(n-6)-d₈ (ácido graso exógeno) en ambas fracciones de lípidos.

La incorporación obtenida (Tabla XXXV) de los dos ácidos grasos y en ambas fracciones lipídicas, en las larvas alimentadas con la dieta algal complementada con las *AAGAM, es hallada por la diferencia existente con la incorporación que presentan las larvas sometidas a una dieta normal con fitoplancton.

*Tabla XXXV: Incorporación del ácido araquidónico deuterado y del ácido oleico, en las fracciones de lípidos neutros y polares de las larvas alimentadas con la dieta mixta (Microalgas + *AAGAM) a lo largo de los siete días que dura la experiencia. Datos expresados en ng/larva.*

	<i>ng/larva</i>			
	18:1(n-9)		20:4(n-6)d₈	
	LP	LN	LP	LN
Día 19	0,48	0,97	0,04	0,04
Día 21	0,67	2,71	0,07	0,07
Día 24	0,50	2,71	0,09	0,08

Con relación al resto de los ácidos grasos aportados por las microalgas, la suplementación con las microcápsulas no afecta a la incorporación de PUFAs esenciales. Sin embargo, las larvas alimentadas con las *AAGAM parecen tener un contenido más alto de ácidos grasos totales (AGTs), comparadas con las que fueron sometidas a una dieta solamente microalgal.

Al hallar los porcentajes de incorporación (Tabla XXXVI), con la misma fórmula descrita anteriormente, observamos de nuevo como en el 20:4(n-6)-d₈, los perfiles de incorporación son similares en ambas fracciones de lípidos a lo largo de la experiencia.

Pero estos porcentajes son más elevados durante los primeros días de la experiencia y disminuyen en los últimos, de 16,3 a 5,6 % en lípidos neutros y de 16,7 a 6,1 % en los lípidos polares. Esto no se corresponde con las cantidades de este ácido graso deuterado encontradas en las larvas ngr/Lv que aumenta de forma contraria sensiblemente. Por lo tanto se puede decir que, no por aumentar el contenido de ácidos grasos en la alimentación, signifique una respuesta proporcional de su asimilación por parte de las larvas.

*Tabla XXXVI: Porcentajes de incorporación del 18:1(n-9) y del 20:4(n-6)-d₈, en lípidos neutros y polares de las larvas alimentadas con microalgas + *AAGAM durante los 7 días de la experiencia.*

	% Incorporación			
	18:1(n-9)		20:4(n-6)-d ₈	
	LP	LN	LP	LN
Día 19	16,17	33,08	16,74	16,32
Día 21	7,53	30,71	10,04	9,76
Día 24	2,84	15,35	6,14	5,58

La incorporación del 18:1(n-9) es mayor en lípidos neutros que en lípidos polares, como ya sucedió en las anteriores experiencias de asimilación. Pero a lo largo de la experiencia, también disminuyó en ambas fracciones, aunque de forma más acusada en los lípidos polares.

Confirmamos por lo tanto, la posibilidad de usar las microcápsulas que contienen los ácidos grasos marcados para estudiar su distribución y conversión metabólica en los lípidos estructurales y de reserva.

De esta forma podemos tener mayor conocimiento de aquellos compuestos esenciales, sobretodo lipídicos, en la nutrición de las larvas de los cultivos de moluscos bivalvos y así, mejorar los rendimientos de producción de semilla, desde la fase de acondicionamiento de progenitores y durante los desarrollos larvarios y postlarvarios.

3.3.- Perspectivas de futuro en el empleo de las microcápsulas como complemento alimenticio y como herramienta de estudios experimentales

En la Tabla XXXVII resumimos las tres experiencias con microcápsulas que incorporaban un ácido graso natural ya presente en las larvas, pero en cantidades mayoritarias [18:1(n-9)] y otro exógeno, diferente al natural por su forma deuterada (ácido araquidónico deuterado, 20:4(n-6)d₈).

Tabla XXXVII: Resumen de las tres experiencias realizadas para demostrar la asimilación, por parte de las larvas de *V. pullastra*, de las microcápsulas de gelatina-acacia que incorporaban 18:1(n-9) y 20:4(n-6)d₈. Se exponen los datos y características de dichas GAM, se describen las dietas aplicadas y, por último, las incorporaciones (en lípidos neutros y polares) halladas por las diferencias de los contenidos de éstos dos ácidos grasos en las larvas alimentadas y no alimentadas con las microcápsulas.

Experiencias	1ª Año 2000 12 horas Ayuno Larvas veliger (± 15 días) Volumen cultivo: 6L Densidad cultivo: 5 Lv/mL	2ª Año 2000 Seguimiento 7 días Larvas veliger (17 días) Volumen cultivo: 150 L Densidad cultivo: 4 Lv/mL	3ª Año 2002 24 horas GAM Larvas veliger (± 15 días) Volumen cultivo: 50 L Densidad cultivo: 5 Lv/mL
*AAGAM	µm AGTs 18:1(n-9) 20:4(n-6)d ₈	3,5 3,8 2,49 0,2	3 1,17 0,78 0,057
DISMINUYEN LOS AGTs, 18:1(n-9) y 20:4(n-6)d ₈			
Dieta	ng/larva	Algas 80 Equiv. 98,3 7,77	*AAGAM 60 Equivalentes 13,2 8,82 0,64
	AGTs 18:1(n-9) 20:4(n-6)d ₈	+5 Equiv. (80±5) Equiv. 102,79 10,71 0,24	*AAGAM CONDICIONES REALES
Incorporación en Larvas (ng/larva)	18:1(n-9)	Algas D0 D1 D3 D7 0,40 0,60 1,20 1,70 3,90 1,40 4,60 4,00	5 Equiv. D1 D3 D7 +0,5 +0,7 +0,5 f=3,86 +0,9 +2,7* +2,7
	LN	0,38 f=1,97 0,75	0,2 f=13,3 2,66*
DISMINUYEN 18:1(n-9) y 20:4(n-6)d ₈			
Incorporación en Larvas (ng/larva)	20:4(n-6)d ₈	LAS µCAP. AUMENTAN LA INCORPORACIÓN MAYOR INCORPORACIÓN EN LN	*AAGAM
	LP	LLEGAN AL ÓPTIMO (*) 3º: MAYOR INCORPORACIÓN EN LN: MAYOR TIEMPO DE ALIMENTACIÓN 1º: MENOR DIFERENCIA EN LA INCORPORACIÓN ENTRE LN Y LP: POSIBLE TRANSVASE DE LN A LP	ÓPTIMO
Incorporación en Larvas (ng/larva)	LP	0,10 f=1,2	0,06 f=2
	LN	0,12	0,12
INCORPORACIÓN DE UN AG. EXÓGENO			
INCORPORACIÓN MÁS EQUILIBRADA ENTRE LN Y LP			
LLEGAN AL ÓPTIMO (*)			
TRANSVASE MENOR			
NO HAY POSIBLE TRANSVASE			

* Aunque se aumente el contenido del Ácido graso en las microcápsulas o el tiempo de alimentación, no aumenta su incorporación en las larvas porque existe un **ÓPTIMO**, es decir, una máxima incorporación
f= Relación entre la incorporación en LN/incorporación en LP

Con estas *AAGAM pudimos demostrar su asimilación y la incorporación de estos dos ácidos grasos en las larvas de almeja babosa. Para ello realizamos pruebas que utilizaban dietas basadas únicamente en las microcápsulas, que se compararon con el estado de ayuno, así como pruebas en donde se suministraban dietas mixtas (microalgas + *AAGAM), frente a dietas tradicionales con fitoplancton.

Demostrada la asimilación de las microcápsulas de gelatina-acacia por parte de las larvas, de estas tres experiencias también se pueden sugerir las siguientes hipótesis:

1.- La forma de incorporación de los ácidos grasos de los aceites y las grasas encapsuladas, va a ser distinta dependiendo del ácido graso.

En este caso, el 18:1(n-9) parece incorporarse de una forma más clara en los lípidos de reserva mientras que el 20:4(n-6)d₈, al igual que su forma natural (ARA), lo hace de forma equilibrada tanto en los lípidos neutros como polares.

2.- El aumento en la dieta del ácido oleico provocado por las microcápsulas, se ve reflejado en su mayor incorporación por parte de las larvas. Sin embargo parece existir un óptimo, es decir, un máximo de incorporación que, aunque también se percibe en el *AA, es más acusado en el 18:1(n-9) puesto que se aporta en mucha mayor cantidad.

A pesar de la mayor cantidad suministrada de ácido graso a la larva, debida a un mayor contenido en las microcápsulas o porque el número de raciones va aumentando a lo largo de los días de cultivo, los individuos alimentados no ven incrementadas las incorporaciones de dicho ácido graso. Esto puede deberse a que existe un máximo que se convierte en el óptimo a partir del cual, ya no se observa más incorporación.

3.- La incorporación en los lípidos neutros y polares podría depender igualmente de posibles procesos de transvase de los ácidos gra-

sos desde las reservas a las estructuras. Esto explicaría las diferencias entre el primer y tercer experimento, siendo el ácido oleico el más afectado, dado que se aporta en mayor cantidad.

Por un lado, en la tercera experiencia existe mayor incorporación sobretodo en lípidos neutros, que en la primera. Además en esta prueba la diferencia de incorporaciones, entre las dos fracciones lipídicas, es mayor.

La razón de todo esto puede ser que las larvas de la última prueba están expuestas durante más tiempo a las microcápsulas, lo que les da tiempo a acumular más ácido oleico en reservas. Asimismo las larvas de la primera pasan por un período de ayuno de 12 horas antes de ser analizadas, período en el que podría existir ese transvase a estructuras, cosa que no ocurre en el último experimento, lo que conlleva a una diferencia mayor.

Las perspectivas de futuro con relación a la investigación con microcápsulas, van a estar fuertemente vinculadas con estas tres hipótesis.

1.- Podremos utilizar estas microcápsulas para conocer qué ácidos grasos son esenciales o están fuertemente vinculados con los buenos desarrollos larvarios, tanto a nivel de la alimentación de los progenitores para conseguir ovocitos de buena calidad, como a nivel de la alimentación aplicada a lo largo de los cultivos

2.- Nos pueden permitir estudiar el comportamiento metabólico y las rutas biosintéticas de estos ácidos grasos, en las distintas fases del cultivo larvario y postlarvario de distintas especies de bivalvos, analizando su evolución y comprobando:

- Su diferente incorporación y almacenamiento en las dos fracciones lipídicas (de reserva y de estructuras).

- Su diferente papel metabólico, bien como sillares estructurales para la construcción de membranas, o bien como combustibles energéticos secundarios.

- Su posible transvase de lípidos de reserva a lípidos estructurales.

3.- Si efectivamente existe un "óptimo" o máxima incorporación, con las microcápsulas de gelatina- acacia conseguiríamos calcular el de cada uno de los ácidos grasos esenciales y, de esta forma, adecuar la ración del alimento aportado a cada una de las fases de los cultivos

4.- Con los resultados de todos estos estudios, estaríamos en condiciones de investigar la posibilidad de utilizar las microcápsulas como suplemento nutricional al fitoplancton en los cultivos de bivalvos marinos. Para ello deberíamos tener en cuenta:

- Que su fabricación debe de tender a conseguir micropartículas pequeñas y con poco contenido lipídico.

- Que según las especies de bivalvos que se alimenten y según en qué fase de su cultivo, los ácidos grasos que se incorporen deben ajustarse a sus necesidades. En este punto nos serán muy útiles, los datos obtenidos con las investigaciones anteriores realizadas con las microcápsulas y también, los estudios de las evoluciones de los ácidos grasos a lo largo de los desarrollos larvarios y postlarvarios de las especies alimentadas.

- En todo caso, según lo visto hasta ahora para la almeja babosa, la relación SAFAs/PUFAs debe de ser equilibrada (1:1) y, no deben aportar un exceso en $\omega 3$ ya que su efecto llegaría a ser negativo para los procesos lipogénicos.

V.- APÉNDICE

V- APÉNDICE

1.- TABLAS

1.1.- ALMEJA BABOSA

1.1.1- Ovocito

1.1.1.1.- Lípidos Polares

Tabla XXXVIII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng ovocito⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Hv LP	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng ovocito ⁻¹	
	1	2	1	2
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	1,01 ± 0,15	0,42 ± 0,05	0,008 ± 0,001	0,004 ± 0,001
16:0	20,78 ± 0,30	15,14 ± 0,04	0,164 ± 0,007	0,127 ± 0,009
18:0	6,15 ± 0,09	5,50 ± 0,09	0,049 ± 0,002	0,046 ± 0,004
16:1(n-7)	1,33 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,011 ± 0,001	0,007 ± 0,001
18:1(n-9)	3,29 ± 0,08	2,87 ± 0,05	0,026 ± 0,001	0,024 ± 0,001
18:1(n-7)	2,03 ± 0,06	1,56 ± 0,12	0,016 ± 0,000	0,013 ± 0,000
20:1(n-11)	0,76 ± 0,02	0,42 ± 0,05	0,006 ± 0,000	0,004 ± 0,001
20:1(n-9)	2,34 ± 0,02	1,79 ± 0,03	0,019 ± 0,001	0,015 ± 0,001
20:1(n-7)	0,70 ± 0,11	0,36 ± 0,03	0,006 ± 0,001	0,003 ± 0,000
18:2(n-6)	2,34 ± 0,02	2,39 ± 0,01	0,019 ± 0,001	0,020 ± 0,001
18:2(n-4)				
18:3(n-6)	0,13 ± 0,00	0,23 ± 0,15	0,001 ± 0,000	0,002 ± 0,001
18:3(n-3)	3,05 ± 0,63	0,54 ± 0,04	0,024 ± 0,004	0,005 ± 0,001
18:4(n-3)	1,14 ± 0,03	0,54 ± 0,54	0,009 ± 0,000	0,005 ± 0,001
20:2(n-6)	2,48 ± 0,34	1,14 ± 0,00	0,020 ± 0,002	0,010 ± 0,001
20:3(n-6)	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
ARA	3,16 ± 0,27	4,31 ± 0,01	0,025 ± 0,003	0,036 ± 0,003
20:4(n-3)	0,38 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,001
EPA	16,47 ± 0,42	15,75 ± 0,26	0,130 ± 0,007	0,132 ± 0,008
21:4(n-6)		0,77 ± 0,20		0,007 ± 0,002
21:5(n-3)	1,71 ± 0,04	1,20 ± 0,09	0,014 ± 0,001	0,010 ± 0,000
22:4(n-6)		1,91 ± 0,03		0,016 ± 0,001
22:5(n-6)	1,27 ± 0,04	2,99 ± 0,06	0,010 ± 0,000	0,025 ± 0,001
22:5(n-3)	3,75 ± 0,73	4,19 ± 0,15	0,030 ± 0,005	0,035 ± 0,001
DHA	25,59 ± 0,52	34,77 ± 0,00	0,202 ± 0,010	0,291 ± 0,022
Tot. SAT.	27,94 ± 0,54	21,10 ± 0,11	0,221 ± 0,011	0,177 ± 0,014
Tot. MONO.	10,46 ± 0,03	7,78 ± 0,08	0,084 ± 0,002	0,066 ± 0,004
Tot. (n-9)	5,64 ± 0,11	4,67 ± 0,01	0,045 ± 0,002	0,039 ± 0,003
Tot. (n-7)	4,06 ± 0,12	2,70 ± 0,12	0,033 ± 0,000	0,023 ± 0,001
Tot. POLI.	61,60 ± 0,51	71,16 ± 0,03	0,488 ± 0,010	0,598 ± 0,045
Tot. (n-6)	9,51 ± 0,09	13,87 ± 0,31	0,076 ± 0,001	0,117 ± 0,011
Tot. (n-3)	52,10 ± 0,42	57,28 ± 0,34	0,412 ± 0,008	0,481 ± 0,033
n-3/n-6			5,4	4,1
Tot. ng x ovocito ⁻¹			0,793 ± 0,023	0,841 ± 0,063

Tabla XXXIX: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng ovocito⁻¹) para dos cultivos malos (3 y 4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Hv LP	CULTIVOS MALOS			
	%		ng ovocito ⁻¹	
	3	4	3	4
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	0,47 ± 0,52	0,67 ± 0,15	0,005 ± 0,005	0,002 ± 0,000
16:0	23,21 ± 1,57	19,50 ± 0,81	0,230 ± 0,004	0,060 ± 0,011
18:0	6,63 ± 0,85	9,06 ± 0,83	0,066 ± 0,005	0,028 ± 0,004
16:1(n-7)	1,11 ± 0,06	1,09 ± 0,45	0,011 ± 0,000	0,004 ± 0,002
18:1(n-9)	0,91 ± 0,05	2,87 ± 0,86	0,009 ± 0,000	0,009 ± 0,001
18:1(n-7)	1,71 ± 0,05	1,95 ± 0,03	0,017 ± 0,001	0,006 ± 0,001
20:1(n-11)	0,46 ± 0,10	1,00 ± 0,22	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,000
20:1(n-9)	1,06 ± 0,02	1,43 ± 0,38	0,011 ± 0,001	0,005 ± 0,002
20:1(n-7)	1,11 ± 0,23	1,14 ± 0,02	0,011 ± 0,003	0,004 ± 0,001
18:2(n-6)	0,35 ± 0,05	1,00 ± 0,22	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,000
18:2(n-4)	0,20 ± 0,13	0,14 ± 0,20	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,000
18:3(n-6)	0,10 ± 0,01		0,001 ± 0,000	
18:3(n-3)	0,66 ± 0,04	0,48 ± 0,13	0,007 ± 0,001	0,002 ± 0,001
18:4(n-3)	1,47 ± 0,15	0,62 ± 0,33	0,015 ± 0,001	0,002 ± 0,001
20:2(n-6)	0,76 ± 0,03	1,62 ± 0,11	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,001
20:3(n-6)	0,15 ± 0,06	0,28 ± 0,40	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001
ARA	2,37 ± 0,05	2,57 ± 0,36	0,024 ± 0,001	0,008 ± 0,003
20:4(n-3)	0,55 ± 0,04	0,48 ± 0,13	0,006 ± 0,001	0,002 ± 0,001
EPA	23,41 ± 0,99	23,82 ± 1,47	0,233 ± 0,022	0,074 ± 0,021
21:4(n-6)	0,21 ± 0,15	0,33 ± 0,07	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,000
21:5(n-3)	2,17 ± 0,04	1,95 ± 0,03	0,022 ± 0,001	0,006 ± 0,001
22:4(n-6)	0,91 ± 0,10	1,34 ± 0,29	0,009 ± 0,001	0,004 ± 0,000
22:5(n-6)	1,11 ± 0,06	1,14 ± 0,02	0,011 ± 0,000	0,004 ± 0,001
22:5(n-3)	3,12 ± 0,27	5,39 ± 0,03	0,031 ± 0,004	0,017 ± 0,004
DHA	25,75 ± 1,58	20,12 ± 0,49	0,256 ± 0,029	0,062 ± 0,012
Tot. SAT.	30,31 ± 2,94	29,23 ± 1,79	0,301 ± 0,013	0,090 ± 0,014
Tot. MONO.	6,36 ± 0,10	9,49 ± 0,23	0,064 ± 0,004	0,029 ± 0,006
Tot. (n-9)	1,97 ± 0,03	4,29 ± 0,48	0,020 ± 0,001	0,013 ± 0,001
Tot. (n-7)	3,93 ± 0,22	4,19 ± 0,47	0,039 ± 0,004	0,013 ± 0,004
Tot. POLI.	63,33 ± 2,84	61,28 ± 2,03	0,633 ± 0,061	0,192 ± 0,047
Tot. (n-6)	5,96 ± 0,02	8,29 ± 0,26	0,061 ± 0,003	0,026 ± 0,006
Tot. (n-3)	57,17 ± 2,73	52,85 ± 1,57	0,570 ± 0,057	0,166 ± 0,040
n-3/n-6			9,3	6,3
Tot. ng x ovocito ⁻¹			0,998 ± 0,052	0,311 ± 0,067

1.1.1.2.- Lípidos Neutros

Tabla XL: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng ovocito⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Hv LN	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng ovocito ⁻¹	
	1	2	1	2
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	3,12 ± 0,10	2,19 ± 0,05	0,062 ± 0,001	0,040 ± 0,001
16:0	18,03 ± 0,68	15,95 ± 0,15	0,359 ± 0,029	0,288 ± 0,009
18:0	4,77 ± 0,29	4,69 ± 0,15	0,095 ± 0,010	0,085 ± 0,001
16:1(n-7)	7,12 ± 0,01	4,69 ± 0,00	0,142 ± 0,006	0,085 ± 0,004
18:1(n-9)	15,85 ± 0,17	17,17 ± 0,04	0,315 ± 0,017	0,310 ± 0,012
18:1(n-7)	5,52 ± 0,00	5,10 ± 0,10	0,110 ± 0,016	0,092 ± 0,006
20:1(n-11)	0,75 ± 0,11	0,67 ± 0,03	0,015 ± 0,003	0,012 ± 0,000
20:1(n-9)	2,31 ± 0,18	1,80 ± 0,04	0,046 ± 0,006	0,033 ± 0,001
20:1(n-7)	0,40 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,008 ± 0,000	0,006 ± 0,000
18:2(n-6)	10,98 ± 0,41	11,32 ± 0,08	0,218 ± 0,001	0,204 ± 0,010
18:2(n-4)	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,008 ± 0,000	0,008 ± 0,001
18:3(n-6)	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001
18:3(n-3)	1,89 ± 0,19	1,83 ± 0,08	0,038 ± 0,002	0,033 ± 0,003
18:4(n-3)	2,99 ± 0,05	2,25 ± 0,03	0,060 ± 0,004	0,041 ± 0,002
20:2(n-6)	3,35 ± 0,03	2,80 ± 0,08	0,067 ± 0,004	0,051 ± 0,001
20:3(n-6)	0,38 ± 0,09	0,25 ± 0,03	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,001
ARA	1,18 ± 0,09	1,75 ± 0,03	0,024 ± 0,001	0,032 ± 0,001
20:4(n-3)	0,75 ± 0,04	0,67 ± 0,03	0,015 ± 0,001	0,012 ± 0,000
EPA	10,99 ± 0,90	11,04 ± 0,17	0,218 ± 0,008	0,199 ± 0,011
21:4(n-6)		0,50 ± 0,02		0,009 ± 0,000
21:5(n-3)	1,01 ± 0,03	0,92 ± 0,00	0,02 ± 0,001	0,017 ± 0,001
22:4(n-6)		0,42 ± 0,02		0,008 ± 0,001
22:5(n-6)	0,20 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,004 ± 0,000	0,011 ± 0,000
22:5(n-3)	1,15 ± 0,16	1,36 ± 0,02	0,023 ± 0,004	0,025 ± 0,001
DHA	6,63 ± 0,68	11,04 ± 0,09	0,132 ± 0,008	0,199 ± 0,010
Tot. SAT.	25,90 ± 0,87	22,84 ± 0,35	0,51 ± 0,040	0,413 ± 0,011
Tot. MONO.	31,96 ± 1,00	29,76 ± 0,01	0,636 ± 0,047	0,538 ± 0,022
Tot. (n-9)	18,16 ± 0,35	18,98 ± 0,08	0,361 ± 0,023	0,342 ± 0,013
Tot. (n-7)	13,05 ± 0,54	10,12 ± 0,09	0,260 ± 0,022	0,183 ± 0,009
Tot. POLI.	42,14 ± 1,87	47,40 ± 0,36	0,837 ± 0,001	0,859 ± 0,042
Tot. (n-6)	16,31 ± 0,35	17,89 ± 0,01	0,324 ± 0,007	0,323 ± 0,013
Tot. (n-3)	25,42 ± 1,50	29,09 ± 0,33	0,505 ± 0,008	0,525 ± 0,028
n-3/n-6			1,6	1,6
Tot. ng x ovocito ⁻¹			1,983 ± 0,086	1,810 ± 0,074

Tabla XLI: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng ovocito⁻¹) para dos cultivos malos (3 y 4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas.

Hv LN	CULTIVOS MALOS			
	%		ng ovocito ⁻¹	
	3	4	3	4
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	4,21 ± 0,49	3,80 ± 0,56	0,116 ± 0,006	0,014 ± 0,004
16:0	17,74 ± 2,88	18,80 ± 1,63	0,488 ± 0,001	0,067 ± 0,013
18:0	4,39 ± 0,80	6,63 ± 1,58	0,121 ± 0,002	0,023 ± 0,003
16:1(n-7)	10,77 ± 0,62	11,57 ± 1,15	0,299 ± 0,032	0,041 ± 0,001
18:1(n-9)	5,66 ± 1,00	8,20 ± 0,65	0,160 ± 0,054	0,029 ± 0,006
18:1(n-7)	7,79 ± 1,37	7,37 ± 0,35	0,220 ± 0,074	0,026 ± 0,004
20:1(n-11)	0,78 ± 0,07	1,01 ± 0,32	0,022 ± 0,006	0,004 ± 0,001
20:1(n-9)	1,81 ± 0,21	1,96 ± 0,58	0,051 ± 0,014	0,007 ± 0,003
20:1(n-7)	1,25 ± 0,10	0,99 ± 0,09	0,035 ± 0,008	0,004 ± 0,001
18:2(n-6)	1,51 ± 0,18	4,62 ± 1,34	0,043 ± 0,012	0,016 ± 0,003
18:2(n-4)	1,10 ± 0,18	1,12 ± 0,27	0,031 ± 0,010	0,004 ± 0,001
18:3(n-6)	0,19 ± 0,04	0,15 ± 0,22	0,006 ± 0,002	0,001 ± 0,001
18:3(n-3)	1,85 ± 0,02	0,99 ± 0,09	0,052 ± 0,008	0,004 ± 0,001
18:4(n-3)	4,54 ± 0,50	1,85 ± 0,01	0,128 ± 0,035	0,007 ± 0,001
20:2(n-6)	1,84 ± 0,13	2,26 ± 0,14	0,052 ± 0,012	0,008 ± 0,001
20:3(n-6)	0,36 ± 0,01	0,57 ± 0,07	0,010 ± 0,001	0,002 ± 0,000
ARA	1,18 ± 0,11	0,83 ± 0,30	0,033 ± 0,008	0,003 ± 0,001
20:4(n-3)	1,41 ± 0,05	0,86 ± 0,10	0,039 ± 0,008	0,003 ± 0,000
EPA	18,21 ± 1,23	18,58 ± 0,45	0,510 ± 0,117	0,066 ± 0,009
21:4(n-6)	0,23 ± 0,01		0,007 ± 0,001	
21:5(n-3)	1,45 ± 0,14	0,99 ± 0,09	0,040 ± 0,003	0,004 ± 0,001
22:4(n-6)	0,27 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,008 ± 0,002	0,001 ± 0,000
22:5(n-6)	0,25 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,007 ± 0,000	0,001 ± 0,000
22:5(n-3)	1,24 ± 0,03	2,03 ± 0,64	0,035 ± 0,005	0,007 ± 0,001
DHA	9,94 ± 0,18	4,24 ± 0,31	0,277 ± 0,040	0,015 ± 0,003
Tot. SAT.	26,34 ± 4,16	29,23 ± 0,61	0,724 ± 0,004	0,103 ± 0,014
Tot. MONO.	28,07 ± 2,13	31,10 ± 0,19	0,787 ± 0,187	0,110 ± 0,013
Tot. (n-9)	7,48 ± 1,21	10,16 ± 1,23	0,211 ± 0,068	0,036 ± 0,008
Tot. (n-7)	19,81 ± 0,84	19,93 ± 0,71	0,554 ± 0,114	0,070 ± 0,006
Tot. POLI.	45,59 ± 2,03	39,68 ± 0,81	1,274 ± 0,264	0,140 ± 0,013
Tot. (n-6)	5,84 ± 0,44	9,02 ± 1,25	0,164 ± 0,039	0,032 ± 0,001
Tot. (n-3)	38,65 ± 1,41	29,54 ± 0,17	1,080 ± 0,216	0,104 ± 0,013
n-3/n-6			6,6	3,3
Tot. ng x ovocito ⁻¹			2,785 ± 0,456	0,353 ± 0,041

1.1.2.- Larva D**1.1.2.1.- Lípidos Polares**

Tabla XLII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Lv D LP	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	1	2	1	2
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	1,43 ± 0,41	1,34 ± 0,39	0,013 ± 0,005	0,023 ± 0,009
16:0	20,94 ± 1,63	19,08 ± 1,49	0,180 ± 0,006	0,327 ± 0,012
18:0	6,39 ± 0,07	8,40 ± 0,089	0,055 ± 0,006	0,144 ± 0,015
16:1(n-7)	2,15 ± 0,00	1,23 ± 0,02	0,019 ± 0,002	0,021 ± 0,002
18:1(n-9)	5,59 ± 0,31	6,07 ± 0,33	0,048 ± 0,003	0,104 ± 0,006
18:1(n-7)	2,62 ± 0,05	2,51 ± 0,048	0,023 ± 0,002	0,043 ± 0,004
20:1(n-11)	1,00 ± 0,20	1,11 ± 0,217	0,009 ± 0,002	0,019 ± 0,002
20:1(n-9)	1,97 ± 0,11	2,10 ± 0,112	0,017 ± 0,003	0,036 ± 0,006
20:1(n-7)	0,33 ± 0,29	0,47 ± 0,409	0,003 ± 0,003	0,008 ± 0,008
18:2(n-6)	3,55 ± 0,16	3,15 ± 0,14	0,031 ± 0,002	0,054 ± 0,004
18:2(n-4)	0,65 ± 0,91		0,012	
18:3(n-6)	0,11 ± 0,15	0,58 ± 0,83	0,002	0,010 ± 0,007
18:3(n-3)	0,70 ± 0,08	1,46 ± 0,17	0,006 ± 0,000	0,025 ± 0,000
18:4(n-3)	1,01 ± 0,54	0,99 ± 0,53	0,009 ± 0,006	0,017 ± 0,011
20:2(n-6)	4,08 ± 0,30	3,79 ± 0,28	0,035 ± 0,001	0,065 ± 0,003
20:3(n-6)	0,35 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,003 ± 0,000	0,004 ± 0,000
ARA	2,28 ± 0,34	2,86 ± 0,43	0,020 ± 0,001	0,049 ± 0,002
20:4(n-3)	0,40 ± 0,20	0,35 ± 0,18	0,004 ± 0,002	0,006 ± 0,004
EPA	9,90 ± 0,46	6,48 ± 0,30	0,085 ± 0,006	0,111 ± 0,007
21:4(n-6)		1,93 ± 0,00		0,033 ± 0,000
21:5(n-3)	2,62 ± 0,05	1,87 ± 0,36	0,023 ± 0,002	0,032 ± 0,003
22:4(n-6)	0,88 ± 1,25	1,81 ± 2,56	0,014	0,031 ± 0,022
22:5(n-6)	0,75 ± 1,06	2,92 ± 4,13	0,014	0,050 ± 0,035
22:5(n-3)	4,55 ± 1,62	3,15 ± 1,12	0,040 ± 0,018	0,054 ± 0,025
DHA	25,75 ± 0,37	26,14 ± 0,38	0,222 ± 0,022	0,448 ± 0,044
Tot. SAT.	28,76 ± 1,29	28,82 ± 1,29	0,247 ± 0,017	0,494 ± 0,034
Tot. MONO.	13,66 ± 0,15	13,48 ± 0,15	0,118 ± 0,012	0,231 ± 0,024
Tot. (n-9)	7,56 ± 0,20	8,17 ± 0,22	0,065 ± 0,006	0,140 ± 0,012
Tot. (n-7)	5,10 ± 0,24	4,20 ± 0,20	0,044 ± 0,007	0,072 ± 0,012
Tot. POLI.	57,58 ± 1,44	57,70 ± 1,44	0,497 ± 0,069	0,989 ± 0,137
Tot. (n-6)	12,01 ± 0,87	17,27 ± 1,25	0,103 ± 0,004	0,296 ± 0,012
Tot. (n-3)	44,93 ± 1,40	40,43 ± 1,26	0,388 ± 0,056	0,693 ± 0,100
n-3/n-6			3,8	2,3
Tot. ng x Lv D ⁻¹			0,862 ± 0,098	1,714 ± 0,194

Tabla XLIII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para el cultivo malo (4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Lv D LP	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3	4	3	4
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0		1,60 ± 0,46		0,023 ± 0,009
16:0		26,01 ± 2,029		0,375 ± 0,013
18:0		17,82 ± 0,19		0,257 ± 0,026
16:1(n-7)		1,60 ± 0,02		0,023 ± 0,003
18:1(n-9)		3,05 ± 0,17		0,044 ± 0,003
18:1(n-7)		2,70 ± 0,052		0,039 ± 0,004
20:1(n-11)		1,04 ± 0,203		0,015 ± 0,001
20:1(n-9)		1,46 ± 0,078		0,021 ± 0,003
20:1(n-7)		0,97 ± 0,85		0,014 ± 0,013
18:2(n-6)		1,25 ± 0,055		0,018 ± 0,001
18:2(n-4)				
18:3(n-6)				
18:3(n-3)		1,73 ± 0,196		0,025 ± 0,000
18:4(n-3)		0,83 ± 0,45		0,012 ± 0,008
20:2(n-6)		2,01 ± 0,15		0,029 ± 0,001
20:3(n-6)		0,83 ± 0,09		0,012 ± 0,000
ARA		1,66 ± 0,25		0,024 ± 0,001
20:4(n-3)		0,55 ± 0,28		0,008 ± 0,005
EPA		10,33 ± 0,49		0,149 ± 0,010
21:4(n-6)		0,55 ± 0,00		0,008 ± 0,000
21:5(n-3)		1,80 ± 0,035		0,026 ± 0,002
22:4(n-6)		1,39 ± 1,96		0,020 ± 0,014
22:5(n-6)		0,90 ± 1,28		0,013 ± 0,009
22:5(n-3)		6,03 ± 2,15		0,087 ± 0,040
DHA		13,87 ± 0,20		0,200 ± 0,020
Tot. SAT.		45,42 ± 2,04		0,655 ± 0,045
Tot. MONO.		10,82 ± 0,12		0,156 ± 0,016
Tot. (n-9)		4,51 ± 0,12		0,065 ± 0,006
Tot. (n-7)		5,27 ± 0,25		0,076 ± 0,012
Tot. POLI.		43,76 ± 1,09		0,631 ± 0,087
Tot. (n-6)		8,60 ± 0,62		0,124 ± 0,005
Tot. (n-3)		25,16 ± 1,09		0,507 ± 0,073
n-3/n-6				4,1
Tot. ng x Lv D ⁻¹				1,442 ± 0,163

1.1.2.2.- Lípidos Neutros

Tabla XLIV: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Lv D LN	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	1	2	1	2
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	3,30 ± 0,21	3,53 ± 0,24	0,068 ± 0,014	0,074 ± 0,015
16:0	21,11 ± 1,62	20,44 ± 1,63	0,435 ± 0,028	0,429 ± 0,027
18:0	5,39 ± 0,31	8,53 ± 0,48	0,111 ± 0,009	0,179 ± 0,015
16:1(n-7)	5,05 ± 0,69	3,67 ± 0,53	0,104 ± 0,030	0,077 ± 0,022
18:1(n-9)	17,71 ± 0,40	14,91 ± 0,34	0,365 ± 0,044	0,313 ± 0,037
18:1(n-7)	5,05 ± 0,69	4,67 ± 0,69	0,104 ± 0,030	0,098 ± 0,028
20:1(n-11)	0,53 ± 0,14	0,86 ± 0,26	0,011 ± 0,001	0,018 ± 0,003
20:1(n-9)	2,28 ± 0,05	1,72 ± 0,051	0,047 ± 0,006	0,036 ± 0,004
20:1(n-7)	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,000
18:2(n-6)	9,70 ± 0,57	8,43 ± 1,02	0,200 ± 0,042	0,177 ± 0,046
18:2(n-4)	0,24 ± 0,10	0,29 ± 0,11	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001
18:3(n-6)	0,39 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,000
18:3(n-3)	1,75 ± 0,13	1,91 ± 0,14	0,036 ± 0,008	0,040 ± 0,009
18:4(n-3)	1,89 ± 0,17	1,81 ± 0,16	0,039 ± 0,009	0,038 ± 0,009
20:2(n-6)	3,49 ± 0,05	2,43 ± 0,04	0,072 ± 0,009	0,051 ± 0,007
20:3(n-6)	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,005	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001
ARA	1,60 ± 0,01	1,43 ± 0,02	0,033 ± 0,005	0,030 ± 0,005
20:4(n-3)	0,58 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,012 ± 0,003	0,007 ± 0,002
EPA	9,46 ± 0,54	5,19 ± 0,32	0,195 ± 0,040	0,109 ± 0,022
21:4(n-6)		0,91 ± 0,00		0,019 ± 0,000
21:5(n-3)	1,12 ± 0,22	0,91 ± 0,19	0,023 ± 0,001	0,019 ± 0,001
22:4(n-6)		0,52 ± 0,00		0,011 ± 0,000
22:5(n-6)	0,34 ± 0,02	0,57 ± 0,016	0,007 ± 0,001	0,012 ± 0,002
22:5(n-3)	1,50 ± 0,50	7,00 ± 2,5	0,031 ± 0,006	0,147 ± 0,032
DHA	6,74 ± 0,73	8,96 ± 1,03	0,139 ± 0,004	0,188 ± 0,005
Tot. SAT.	29,79 ± 1,73	32,49 ± 1,93	0,614 ± 0,051	0,682 ± 0,057
Tot. MONO.	30,96 ± 0,78	26,16 ± 0,68	0,638 ± 0,108	0,549 ± 0,092
Tot. (n-9)	19,99 ± 0,45	16,63 ± 0,39	0,412 ± 0,049	0,349 ± 0,042
Tot. (n-7)	10,43 ± 1,37	8,67 ± 1,201	0,215 ± 0,060	0,182 ± 0,051
Tot. POLI.	39,25 ± 0,95	41,35 ± 0,91	0,809 ± 0,151	0,868 ± 0,142
Tot. (n-6)	15,96 ± 1,61	14,96 ± 1,22	0,329 ± 0,096	0,314 ± 0,070
Tot. (n-3)	23,05 ± 0,56	26,11 ± 0,69	0,475 ± 0,056	0,548 ± 0,064
n-3/n-6			1,4	1,8
Tot. ng x Lv D ⁻¹			2,061 ± 0,310	2,099 ± 0,299

Tabla XLV: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para el cultivo malo (4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

Lv D LN	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3	4	3	4
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0		3,31 ± 0,217		0,026 ± 0,005
16:0		20,23 ± 1,614		0,159 ± 0,010
18:0		9,80 ± 0,56		0,077 ± 0,007
16:1(n-7)		6,62 ± 0,97		0,052 ± 0,015
18:1(n-9)		9,80 ± 0,22		0,077 ± 0,009
18:1(n-7)		7,00 ± 1,03		0,055 ± 0,016
20:1(n-11)		0,89 ± 0,29		0,007 ± 0,001
20:1(n-9)		2,93 ± 0,09		0,023 ± 0,003
20:1(n-7)		1,40 ± 0,154		0,011 ± 0,000
18:2(n-6)		7,00 ± 0,85		0,055 ± 0,014
18:2(n-4)		2,42 ± 0,87		0,019 ± 0,004
18:3(n-6)				
18:3(n-3)		0,89 ± 0,066		0,007 ± 0,001
18:4(n-3)		1,02 ± 0,092		0,008 ± 0,002
20:2(n-6)		2,29 ± 0,034		0,018 ± 0,002
20:3(n-6)		2,04 ± 0,023		0,016 ± 0,002
ARA		1,02 ± 0,01		0,008 ± 0,001
20:4(n-3)		0,89 ± 0,078		0,007 ± 0,002
EPA		8,78 ± 0,54		0,069 ± 0,014
21:4(n-6)				
21:5(n-3)		0,51 ± 0,10		0,004 ± 0,000
22:4(n-6)				
22:5(n-6)				
22:5(n-3)		8,52 ± 2,99		0,067 ± 0,014
DHA		2,67 ± 0,31		0,021 ± 0,001
Tot. SAT.		33,33 ± 1,98		0,262 ± 0,022
Tot. MONO.		28,63 ± 0,74		0,225 ± 0,038
Tot. (n-9)		12,72 ± 0,299		0,100 ± 0,012
Tot. (n-7)		15,01 ± 2,08		0,118 ± 0,033
Tot. POLI.		38,04 ± 0,84		0,299 ± 0,049
Tot. (n-6)		12,34 ± 1,001		0,097 ± 0,021
Tot. (n-3)		23,28 ± 0,62		0,183 ± 0,021
n-3/n-6				1,9
Tot. ng x Lv D ⁻¹				0,786 ± 0,112

1.1.3.- Larva Veliger temprana (6-8 días)**1.1.3.1- Lípidos Polares**

Tabla XLVI: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

6-8 días LP	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	1 (7 días) Media ± SD	2 (8 días) Media ± SD	1 (7 días) Media ± SD	2 (8 días) Media ± SD
Ácidos Grasos				
14:0	1,65 ± 0,35	2,05 ± 0,45	0,050 ± 0,018	0,101 ± 0,037
16:0	17,87 ± 2,03	20,45 ± 2,33	0,531 ± 0,140	1,009 ± 0,266
18:0	6,38 ± 0,30	9,50 ± 0,48	0,189 ± 0,037	0,469 ± 0,095
16:1(n-7)	1,37 ± 0,27	2,19 ± 0,44	0,041 ± 0,014	0,108 ± 0,037
18:1(n-9)	5,10 ± 0,33	3,99 ± 0,25	0,151 ± 0,033	0,197 ± 0,042
18:1(n-7)	4,08 ± 0,39	4,52 ± 0,42	0,121 ± 0,030	0,223 ± 0,054
20:1(n-11)	0,76 ± 0,10	0,95 ± 0,11	0,023 ± 0,006	0,047 ± 0,013
20:1(n-9)	2,60 ± 0,08	2,47 ± 0,086	0,077 ± 0,009	0,122 ± 0,014
20:1(n-7)	0,61 ± 0,00	0,81 ± 0,017	0,018 ± 0,003	0,040 ± 0,005
18:2(n-6)	2,34 ± 0,20	2,37 ± 0,196	0,070 ± 0,016	0,117 ± 0,027
18:2(n-4)	0,20 ± 0,02	0,43 ± 0,04	0,006 ± 0,001	0,021 ± 0,003
18:3(n-6)	0,17 ± 0,02	0,39 ± 0,083	0,005 ± 0,001	0,019 ± 0,007
18:3(n-3)	3,65 ± 0,69	2,35 ± 0,446	0,109 ± 0,037	0,116 ± 0,039
18:4(n-3)	1,86 ± 0,10	1,74 ± 0,087	0,055 ± 0,011	0,086 ± 0,017
20:2(n-6)	5,99 ± 0,19	6,85 ± 0,221	0,176 ± 0,021	0,338 ± 0,040
20:3(n-6)	0,32 ± 0,03	0,30 ± 0,018	0,010 ± 0,001	0,015 ± 0,001
ARA	2,04 ± 0,07	2,63 ± 0,097	0,060 ± 0,007	0,130 ± 0,015
20:4(n-3)	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,013	0,011 ± 0,001	0,016 ± 0,002
EPA	5,81 ± 0,50	10,05 ± 0,87	0,170 ± 0,011	0,496 ± 0,032
21:4(n-6)	0,39 ± 0,04	0,91 ± 0,05	0,012 ± 0,001	0,045 ± 0,004
21:5(n-3)	3,33 ± 0,29	3,14 ± 0,28	0,098 ± 0,006	0,155 ± 0,010
22:4(n-6)		1,11 ± 0,00		0,055 ± 0,000
22:5(n-6)	4,63 ± 0,39	3,97 ± 0,35	0,136 ± 0,009	0,196 ± 0,013
22:5(n-3)	2,56 ± 0,20	0,91 ± 0,072	0,075 ± 0,006	0,045 ± 0,003
DHA	25,92 ± 2,98	15,58 ± 1,79	0,757 ± 0,028	0,769 ± 0,029
Tot. SAT.	25,90 ± 2,68	32,00 ± 3,37	0,769 ± 0,195	1,579 ± 0,403
Tot. MONO.	14,52 ± 1,01	14,93 ± 0,99	0,430 ± 0,095	0,737 ± 0,160
Tot. (n-9)	7,70 ± 0,24	6,46 ± 0,196	0,228 ± 0,042	0,319 ± 0,058
Tot. (n-7)	6,06 ± 0,66	7,52 ± 0,79	0,180 ± 0,047	0,371 ± 0,095
Tot. POLI.	59,58 ± 3,69	53,07 ± 3,29	1,747 ± 0,158	2,619 ± 0,237
Tot. (n-6)	15,89 ± 0,50	18,54 ± 0,57	0,467 ± 0,057	0,915 ± 0,111
Tot. (n-3)	43,49 ± 3,21	34,10 ± 2,51	1,274 ± 0,100	1,683 ± 0,132
n-3/n-6			2,7	1,8
Tot. ng x Lv ⁻¹			2,946 ± 0,448	4,935 ± 0,75

Tabla XLVII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para el cultivo malo (3). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

6 días LP	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3 (6 días)	4	3 (6 días)	4
Ácidos Grasos	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
14:0	1,63 ± 0,57		0,025 ± 0,013	
16:0	18,65 ± 1,75		0,278 ± 0,071	
18:0	6,93 ± 1,03		0,104 ± 0,032	
16:1(n-7)	1,76 ± 0,21		0,026 ± 0,007	
18:1(n-9)	3,83 ± 0,61		0,056 ± 0,000	
18:1(n-7)	4,18 ± 0,35		0,063 ± 0,015	
20:1(n-11)	0,97 ± 0,35		0,015 ± 0,007	
20:1(n-9)	1,31 ± 0,01		0,020 ± 0,004	
20:1(n-7)	0,61 ± 0,32		0,009 ± 0,006	
18:2(n-6)	2,42 ± 0,26		0,036 ± 0,002	
18:2(n-4)	0,24 ± 0,08		0,004 ± 0,001	
18:3(n-6)	0,67 ± 0,10		0,010 ± 0,000	
18:3(n-3)	3,54 ± 0,45		0,053 ± 0,016	
18:4(n-3)	3,11 ± 0,74		0,046 ± 0,004	
20:2(n-6)	3,93 ± 0,54		0,058 ± 0,001	
20:3(n-6)	0,25 ± 0,35		0,004 ± 0,006	
ARA	1,09 ± 0,17		0,016 ± 0,000	
20:4(n-3)	0,48 ± 0,03		0,008 ± 0,001	
EPA	4,06 ± 0,00		0,060 ± 0,010	
21:4(n-6)	0,66 ± 0,58		0,011 ± 0,011	
21:5(n-3)	2,95 ± 0,07		0,044 ± 0,008	
22:4(n-6)	0,97 ± 0,04		0,015 ± 0,002	
22:5(n-6)	3,78 ± 0,16		0,056 ± 0,007	
22:5(n-3)	2,30 ± 0,12		0,034 ± 0,004	
DHA	29,67 ± 3,17		0,436 ± 0,024	
Tot. SAT.	27,20 ± 3,34		0,407 ± 0,115	
Tot. MONO.	12,66 ± 0,62		0,188 ± 0,039	
Tot. (n-9)	5,14 ± 0,60		0,075 ± 0,003	
Tot. (n-7)	6,55 ± 0,87		0,098 ± 0,029	
Tot. POLI.	60,13 ± 3,96		0,886 ± 0,085	
Tot. (n-6)	13,78 ± 0,35		0,204 ± 0,028	
Tot. (n-3)	46,11 ± 3,54		0,679 ± 0,058	
n-3/n-6			3,3	
Tot. ng x Lv ⁻¹			1,481 ± 0,239	

1.1.3.2- Lípidos Neutros

Tabla XLVIII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

6-8 días LN		CULTIVOS BUENOS		
Ácidos Grasos	%		ng larva ⁻¹	
	1 (7 días) Media ± SD	2 (8 días) Media ± SD	1 (7 días) Media ± SD	2 (8 días) Media ± SD
14:0	7,91 ± 1,10	13,01 ± 1,14	0,201 ± 0,036	0,917 ± 0,017
16:0	12,65 ± 0,27	18,29 ± 1,78	0,320 ± 0,006	1,289 ± 0,011
18:0	4,06 ± 0,19	5,67 ± 0,02	0,103 ± 0,001	0,402 ± 0,044
16:1(n-7)	5,34 ± 0,29	6,41 ± 1,68	0,135 ± 0,013	0,460 ± 0,167
18:1(n-9)	12,39 ± 0,11	7,78 ± 1,87	0,313 ± 0,016	0,558 ± 0,191
18:1(n-7)	4,89 ± 0,05	5,24 ± 1,39	0,124 ± 0,006	0,377 ± 0,138
20:1(n-11)	0,24 ± 0,05	0,33 ± 0,20	0,006 ± 0,001	0,024 ± 0,017
20:1(n-9)	1,27 ± 0,06	0,86 ± 0,14	0,032 ± 0,003	0,062 ± 0,016
20:1(n-7)	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,006 ± 0,000	0,018 ± 0,000
18:2(n-6)	10,16 ± 0,48	8,75 ± 0,52	0,257 ± 0,023	0,618 ± 0,029
18:2(n-4)	0,26 ± 0,02	1,12 ± 0,60	0,007 ± 0,001	0,077 ± 0,034
18:3(n-6)	0,20 ± 0,01	0,53 ± 0,21	0,005 ± 0,000	0,039 ± 0,019
18:3(n-3)	7,77 ± 0,54	6,07 ± 0,74	0,196 ± 0,006	0,427 ± 0,007
18:4(n-3)	7,25 ± 0,41	5,11 ± 0,28	0,183 ± 0,003	0,361 ± 0,018
20:2(n-6)	3,07 ± 0,21	1,95 ± 0,84	0,078 ± 0,002	0,142 ± 0,074
20:3(n-6)	0,44 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,011 ± 0,000	0,011 ± 0,005
ARA	0,85 ± 0,11	0,92 ± 0,56	0,022 ± 0,004	0,067 ± 0,047
20:4(n-3)	0,24 ± 0,01	0,16 ± 0,11	0,006 ± 0,000	0,012 ± 0,009
EPA	4,02 ± 0,08	6,52 ± 0,56	0,102 ± 0,002	0,460 ± 0,009
21:4(n-6)		0,48 ± 0,01		0,034 ± 0,003
21:5(n-3)	0,69 ± 0,06	0,56 ± 0,31	0,018 ± 0,002	0,039 ± 0,018
22:4(n-6)		0,49 ± 0,19		0,034 ± 0,010
22:5(n-6)	2,14 ± 0,14	1,47 ± 0,62	0,054 ± 0,001	0,102 ± 0,033
22:5(n-3)	1,49 ± 0,42	2,84 ± 0,02	0,038 ± 0,009	0,201 ± 0,020
DHA	12,43 ± 0,00	5,06 ± 0,29	0,314 ± 0,013	0,357 ± 0,017
Tot. SAT.	24,63 ± 0,64	36,97 ± 2,90	0,624 ± 0,042	2,608 ± 0,071
Tot. MONO.	24,36 ± 0,54	20,87 ± 5,26	0,616 ± 0,039	1,499 ± 0,529
Tot. (n-9)	13,65 ± 0,17	8,64 ± 2,01	0,345 ± 0,018	0,620 ± 0,207
Tot. (n-7)	10,46 ± 0,33	11,90 ± 3,04	0,265 ± 0,019	0,855 ± 0,305
Tot. POLI.	51,01 ± 1,19	42,16 ± 2,36	1,291 ± 0,023	2,981 ± 0,148
Tot. (n-6)	16,86 ± 0,21	14,73 ± 0,33	0,427 ± 0,023	1,047 ± 0,134
Tot. (n-3)	33,90 ± 1,41	26,31 ± 2,09	0,857 ± 0,001	1,857 ± 0,049
n-3/n-6			2,0	1,8
Tot. ng x Lv ⁻¹			2,531 ± 0,103	7,088 ± 0,749

Tabla XLIX: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para el cultivo malo (3). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

6 días LN	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3 (6 días) Media ± SD	4 Media ± SD	3 (6 días) Media ± SD	4 Media ± SD
Ácidos Grasos				
14:0	6,27 ± 0,61		0,162 ± 0,035	
16:0	14,46 ± 1,65		0,373 ± 0,086	
18:0	5,56 ± 1,00		0,144 ± 0,042	
16:1(n-7)	10,66 ± 0,77		0,272 ± 0,013	
18:1(n-9)	9,14 ± 0,34		0,234 ± 0,019	
18:1(n-7)	3,98 ± 1,00		0,101 ± 0,013	
20:1(n-11)	0,35 ± 0,04		0,009 ± 0,000	
20:1(n-9)	0,75 ± 0,09		0,019 ± 0,000	
20:1(n-7)	0,63 ± 0,13		0,016 ± 0,001	
18:2(n-6)	7,31 ± 1,83		0,185 ± 0,025	
18:2(n-4)	0,35 ± 0,04		0,009 ± 0,000	
18:3(n-6)	0,65 ± 0,16		0,017 ± 0,002	
18:3(n-3)	11,95 ± 0,75		0,305 ± 0,017	
18:4(n-3)	8,35 ± 0,30		0,214 ± 0,018	
20:2(n-6)	1,49 ± 0,18		0,039 ± 0,009	
20:3(n-6)	0,37 ± 0,02		0,010 ± 0,001	
ARA	0,35 ± 0,01		0,009 ± 0,001	
20:4(n-3)	0,39 ± 0,01		0,010 ± 0,001	
EPA	1,97 ± 0,02		0,051 ± 0,006	
21:4(n-6)	0,93 ± 0,11		0,024 ± 0,006	
21:5(n-3)	0,95 ± 0,08		0,025 ± 0,005	
22:4(n-6)				
22:5(n-6)	1,43 ± 0,27		0,037 ± 0,011	
22:5(n-3)	0,47 ± 0,06		0,012 ± 0,003	
DHA	11,22 ± 1,46		0,290 ± 0,071	
Tot. SAT.	26,30 ± 3,26		0,679 ± 0,163	
Tot. MONO.	25,52 ± 2,36		0,650 ± 0,017	
Tot. (n-9)	9,88 ± 0,43		0,253 ± 0,019	
Tot. (n-7)	15,28 ± 1,89		0,389 ± 0,002	
Tot. POLI.	48,19 ± 0,90		1,233 ± 0,123	
Tot. (n-6)	12,54 ± 1,43		0,319 ± 0,001	
Tot. (n-3)	35,30 ± 0,57		0,905 ± 0,122	
n-3/n-6			2,8	
Tot. ng x Lv ⁻¹			2,562 ± 0,303	

1.1.4.- Larva Pediveliger (15-22 días)**1.1.4.1- Lípidos Polares**

Tabla L: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

15 días LP		CULTIVOS BUENOS		
Ácidos Grasos	%		ng larva ⁻¹	
	1 (15 días) Media ± SD	2 (15 días) Media ± SD	1 (15 días) Media ± SD	2 (15 días) Media ± SD
14:0	2,03 ± 0,67	2,73 ± 0,59	0,162 ± 0,013	0,554 ± 0,033
16:0	24,37 ± 8,68	24,23 ± 3,46	1,939 ± 0,210	4,943 ± 0,078
18:0	8,21 ± 2,86	10,54 ± 1,02	0,654 ± 0,065	2,159 ± 0,136
16:1(n-7)	1,68 ± 0,00	2,27 ± 0,28	0,140 ± 0,035	0,463 ± 0,016
18:1(n-9)	4,95 ± 0,20	4,43 ± 0,32	0,410 ± 0,088	0,908 ± 0,079
18:1(n-7)	5,11 ± 0,20	3,76 ± 0,20	0,424 ± 0,091	0,773 ± 0,082
20:1(n-11)	0,79 ± 0,00	1,53 ± 0,20	0,066 ± 0,016	0,313 ± 0,009
20:1(n-9)	2,97 ± 0,02	2,17 ± 0,02	0,247 ± 0,061	0,448 ± 0,067
20:1(n-7)	1,94 ± 1,43	0,99 ± 0,00	0,147 ± 0,078	0,204 ± 0,033
18:2(n-6)	1,52 ± 0,19	1,59 ± 0,07	0,129 ± 0,048	0,326 ± 0,037
18:2(n-4)	0,84 ± 0,32	0,23 ± 0,00	0,074 ± 0,045	0,048 ± 0,008
18:3(n-6)	0,13 ± 0,04	0,56 ± 0,01	0,011 ± 0,006	0,116 ± 0,016
18:3(n-3)	3,23 ± 0,29	1,69 ± 0,06	0,272 ± 0,092	0,347 ± 0,042
18:4(n-3)	1,43 ± 0,37	1,49 ± 0,02	0,123 ± 0,061	0,307 ± 0,044
20:2(n-6)	4,84 ± 0,81	4,50 ± 0,03	0,412 ± 0,169	0,929 ± 0,153
20:3(n-6)	0,16 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,014 ± 0,006	0,094 ± 0,021
ARA	1,82 ± 0,42	3,89 ± 0,51	0,156 ± 0,074	0,812 ± 0,232
20:4(n-3)	0,22 ± 0,06	0,43 ± 0,04	0,019 ± 0,009	0,088 ± 0,006
EPA	3,46 ± 1,14	9,30 ± 1,46	0,301 ± 0,168	1,943 ± 0,606
21:4(n-6)	0,49 ± 0,01	1,11 ± 0,02	0,041 ± 0,011	0,229 ± 0,032
21:5(n-3)	2,12 ± 0,64	2,91 ± 0,46	0,183 ± 0,098	0,607 ± 0,190
22:4(n-6)		1,62 ± 0,22		0,339 ± 0,098
22:5(n-6)	5,22 ± 1,43	3,22 ± 0,59	0,450 ± 0,228	0,675 ± 0,228
22:5(n-3)	1,02 ± 0,12	1,43 ± 0,15	0,084 ± 0,011	0,299 ± 0,078
DHA	21,45 ± 8,42	12,94 ± 2,88	1,875 ± 1,153	2,717 ± 1,018
Tot. SAT.	34,62 ± 12,20	37,50 ± 5,07	2,755 ± 0,288	7,656 ± 0,181
Tot. MONO.	17,43 ± 1,85	15,14 ± 1,02	1,434 ± 0,213	3,109 ± 0,286
Tot. (n-9)	7,92 ± 0,22	6,60 ± 0,34	0,657 ± 0,148	1,356 ± 0,146
Tot. (n-7)	8,73 ± 1,63	7,02 ± 0,48	0,711 ± 0,048	1,440 ± 0,130
Tot. POLI.	47,95 ± 14,04	47,36 ± 6,09	4,144 ± 2,178	9,876 ± 2,808
Tot. (n-6)	14,18 ± 2,93	16,95 ± 1,26	1,213 ± 0,542	3,520 ± 0,816
Tot. (n-3)	32,93 ± 10,79	30,18 ± 4,82	2,857 ± 1,591	6,308 ± 1,983
n-3/n-6			2,3	1,8
Tot. ng x Lv ⁻¹			8,333 ± 2,103	20,641 ± 3,275

Tabla LI: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos malos (3 y 4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

18-22 días LP	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3 (22 días) Media ± SD	4 (18 días) Media ± SD	3 (22 días) Media ± SD	4 (18 días) Media ± SD
Ácidos Grasos				
14:0	1,03 ± 0,13	1,55 ± 0,20	0,220 ± 0,025	0,298 ± 0,035
16:0	17,83 ± 0,54	18,69 ± 0,57	3,795 ± 0,066	3,583 ± 0,062
18:0	8,13 ± 0,47	8,07 ± 0,46	1,730 ± 0,077	1,548 ± 0,069
16:1(n-7)	3,49 ± 0,21	1,68 ± 0,10	0,743 ± 0,035	0,323 ± 0,015
18:1(n-9)	3,02 ± 0,04	4,55 ± 0,06	0,644 ± 0,001	0,873 ± 0,001
18:1(n-7)	4,16 ± 0,07	3,40 ± 0,05	0,885 ± 0,003	0,651 ± 0,002
20:1(n-11)	0,75 ± 0,11	1,01 ± 0,14	0,159 ± 0,021	0,194 ± 0,025
20:1(n-9)	1,54 ± 0,09	2,32 ± 0,14	0,327 ± 0,024	0,445 ± 0,032
20:1(n-7)	1,19 ± 0,03	0,84 ± 0,02	0,253 ± 0,002	0,162 ± 0,001
18:2(n-6)	1,31 ± 0,05	1,57 ± 0,063	0,280 ± 0,015	0,302 ± 0,016
18:2(n-4)	0,14 ± 0,01	0,92 ± 0,072	0,031 ± 0,002	0,176 ± 0,012
18:3(n-6)	0,13 ± 0,03	0,20 ± 0,054	0,029 ± 0,008	0,039 ± 0,011
18:3(n-3)	3,21 ± 0,24	5,90 ± 0,43	0,684 ± 0,059	1,132 ± 0,098
18:4(n-3)	1,55 ± 0,07	1,89 ± 0,08	0,329 ± 0,018	0,363 ± 0,020
20:2(n-6)	3,78 ± 0,13	3,90 ± 0,13	0,805 ± 0,038	0,747 ± 0,035
20:3(n-6)	0,17 ± 0,06	0,24 ± 0,09	0,037 ± 0,013	0,046 ± 0,016
ARA	2,95 ± 0,21	2,39 ± 0,18	0,628 ± 0,054	0,459 ± 0,040
20:4(n-3)	0,34 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,072 ± 0,011	0,070 ± 0,010
EPA	7,90 ± 0,22	7,21 ± 0,20	1,681 ± 0,068	1,383 ± 0,056
21:4(n-6)	0,62 ± 0,19	0,86 ± 0,26	0,132 ± 0,038	0,164 ± 0,047
21:5(n-3)	3,14 ± 0,23	2,94 ± 0,22	0,669 ± 0,059	0,564 ± 0,049
22:4(n-6)	0,79 ± 0,04	1,16 ± 0,07	0,169 ± 0,011	0,223 ± 0,015
22:5(n-6)	5,63 ± 0,15	4,23 ± 0,12	1,199 ± 0,048	0,811 ± 0,033
22:5(n-3)	0,91 ± 0,06	1,22 ± 0,07	0,195 ± 0,009	0,234 ± 0,011
DHA	26,29 ± 0,39	22,87 ± 0,34	5,597 ± 0,156	4,385 ± 0,122
Tot. SAT.	26,99 ± 1,14	28,31 ± 1,20	5,744 ± 0,168	5,429 ± 0,159
Tot. MONO.	14,14 ± 0,36	13,81 ± 0,35	3,009 ± 0,037	2,648 ± 0,032
Tot. (n-9)	4,56 ± 0,05	6,87 ± 0,07	0,971 ± 0,023	1,318 ± 0,031
Tot. (n-7)	8,83 ± 0,30	5,92 ± 0,20	1,880 ± 0,040	1,136 ± 0,024
Tot. POLI.	58,87 ± 1,50	57,88 ± 1,47	12,534 ± 0,483	11,098 ± 0,428
Tot. (n-6)	15,40 ± 0,38	14,56 ± 0,34	3,278 ± 0,123	2,791 ± 0,105
Tot. (n-3)	43,33 ± 1,14	42,40 ± 1,11	9,225 ± 0,362	8,131 ± 0,318
n-3/n-6			2,8	2,9
Tot. ng x Lv ⁻¹			21,287 ± 0,278	19,175 ± 0,251

1.1.4.2- Lípidos Neutros

Tabla LII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

15 días LN	CULTIVOS BUENOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	1 (15 días) Media ± SD	2 (15 días) Media ± SD	1 (15 días) Media ± SD	2 (15 días) Media ± SD
Ácidos Grasos				
14:0	9,15 ± 1,53	17,60 ± 7,22	0,490 ± 0,132	2,520 ± 0,987
16:0	17,97 ± 3,02	23,07 ± 3,17	0,962 ± 0,257	3,314 ± 0,388
18:0	5,44 ± 1,17	6,93 ± 0,77	0,288 ± 0,064	0,996 ± 0,091
16:1(n-7)	6,21 ± 1,28	7,66 ± 0,57	0,360 ± 0,218	1,102 ± 0,105
18:1(n-9)	9,91 ± 2,03	5,79 ± 0,85	0,575 ± 0,347	0,834 ± 0,139
18:1(n-7)	5,99 ± 1,04	5,17 ± 0,96	0,345 ± 0,199	0,746 ± 0,153
20:1(n-11)	0,24 ± 0,09	1,81 ± 0,65	0,013 ± 0,001	0,259 ± 0,088
20:1(n-9)	1,90 ± 0,19	0,97 ± 0,09	0,104 ± 0,035	0,139 ± 0,016
20:1(n-7)	4,63 ± 3,77	0,41 ± 0,02	0,213 ± 0,100	0,059 ± 0,002
18:2(n-6)	5,84 ± 1,41	3,79 ± 1,25	0,341 ± 0,216	0,548 ± 0,190
18:2(n-4)	0,27 ± 0,09	0,33 ± 0,03	0,016 ± 0,011	0,048 ± 0,006
18:3(n-6)	0,06 ± 0,03	0,95 ± 0,53	0,003 ± 0,000	0,137 ± 0,079
18:3(n-3)	4,53 ± 1,20	2,60 ± 1,12	0,266 ± 0,174	0,376 ± 0,168
18:4(n-3)	6,04 ± 1,14	2,47 ± 0,92	0,349 ± 0,206	0,357 ± 0,139
20:2(n-6)	2,60 ± 0,10	1,63 ± 0,56	0,146 ± 0,067	0,235 ± 0,085
20:3(n-6)	0,53 ± 0,28	0,26 ± 0,14	0,026 ± 0,003	0,037 ± 0,021
ARA	1,47 ± 0,08	1,71 ± 0,96	0,081 ± 0,030	0,247 ± 0,143
20:4(n-3)	0,37 ± 0,35	0,20 ± 0,00	0,017 ± 0,011	0,029 ± 0,001
EPA	4,40 ± 0,51	4,30 ± 2,45	0,251 ± 0,132	0,622 ± 0,366
21:4(n-6)		0,87 ± 0,20		0,125 ± 0,027
21:5(n-3)	0,75 ± 0,01	0,95 ± 0,15	0,042 ± 0,018	0,138 ± 0,025
22:4(n-6)		0,97 ± 0,35		0,141 ± 0,053
22:5(n-6)	1,78 ± 0,59	5,01 ± 1,27	0,106 ± 0,075	0,723 ± 0,198
22:5(n-3)	1,02 ± 0,93	1,86 ± 0,42	0,046 ± 0,028	0,268 ± 0,066
DHA	8,89 ± 2,03	2,68 ± 0,60	0,518 ± 0,323	0,385 ± 0,078
Tot. SAT.	32,55 ± 5,72	47,60 ± 11,16	1,740 ± 0,453	6,830 ± 1,466
Tot. MONO.	28,89 ± 0,30	21,80 ± 1,80	1,610 ± 0,700	3,139 ± 0,322
Tot. (n-9)	11,82 ± 1,84	6,76 ± 0,93	0,679 ± 0,382	0,973 ± 0,154
Tot. (n-7)	16,83 ± 1,45	13,24 ± 1,51	0,918 ± 0,317	1,907 ± 0,256
Tot. POLI.	38,55 ± 5,42	30,59 ± 9,36	2,208 ± 1,213	4,416 ± 1,435
Tot. (n-6)	12,27 ± 1,72	15,19 ± 4,85	0,703 ± 0,386	2,193 ± 0,742
Tot. (n-3)	26,01 ± 3,61	15,07 ± 4,47	1,489 ± 0,816	2,175 ± 0,687
n-3/n-6			2,1	1,0
Tot. ng x Lv ⁻¹			5,555 ± 2,366	14,385 ± 0,292

Tabla LIII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos malos (3 y 4). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

18-22 días LN	CULTIVOS MALOS			
	%		ng larva ⁻¹	
	3 (22 días) Media ± SD	4 (18 días) Media ± SD	3 (22 días) Media ± SD	4 (18 días) Media ± SD
Ácidos Grasos				
14:0	6,51 ± 0,13	10,02 ± 0,197	4,326 ± 1,170	1,065 ± 0,29
16:0	14,95 ± 0,40	17,19 ± 0,46	10,001 ± 3,149	1,828 ± 0,58
18:0	3,79 ± 0,13	6,40 ± 0,22	2,540 ± 0,820	0,681 ± 0,220
16:1(n-7)	16,90 ± 1,47	7,54 ± 0,66	11,122 ± 2,283	0,802 ± 0,165
18:1(n-9)	6,12 ± 0,37	7,87 ± 0,48	4,044 ± 0,933	0,837 ± 0,193
18:1(n-7)	7,91 ± 0,53	4,78 ± 0,32	5,326 ± 1,881	0,508 ± 0,179
20:1(n-11)	0,09 ± 0,00	0,23 ± 0,006	0,057 ± 0,015	0,024 ± 0,006
20:1(n-9)	0,74 ± 0,09	1,00 ± 0,126	0,502 ± 0,205	0,106 ± 0,043
20:1(n-7)	0,57 ± 0,01	0,36 ± 0,005	0,377 ± 0,105	0,038 ± 0,010
18:2(n-6)	5,53 ± 0,37	6,83 ± 0,46	3,722 ± 1,314	0,726 ± 0,26
18:2(n-4)	0,46 ± 0,00	0,65 ± 0,005	0,307 ± 0,087	0,069 ± 0,019
18:3(n-6)	0,51 ± 0,02	0,53 ± 0,017	0,339 ± 0,108	0,056 ± 0,018
18:3(n-3)	5,99 ± 0,38	7,88 ± 0,5	4,027 ± 1,406	0,838 ± 0,293
18:4(n-3)	6,95 ± 0,78	8,21 ± 0,92	4,707 ± 1,860	0,873 ± 0,345
20:2(n-6)	2,51 ± 0,07	1,38 ± 0,04	1,664 ± 0,440	0,147 ± 0,039
20:3(n-6)	0,18 ± 0,03	0,47 ± 0,08	0,124 ± 0,054	0,050 ± 0,022
ARA	1,57 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,049 ± 0,332	0,154 ± 0,049
20:4(n-3)	0,28 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,188 ± 0,062	0,049 ± 0,016
EPA	6,74 ± 0,38	8,25 ± 0,47	4,457 ± 1,047	0,877 ± 0,206
21:4(n-6)	0,27 ± 0,14	0,21 ± 0,107	0,169 ± 0,043	0,022 ± 0,006
21:5(n-3)	0,61 ± 0,01	0,57 ± 0,009	0,411 ± 0,125	0,061 ± 0,019
22:4(n-6)	0,04 ± 0,06		0,032 ± 0,045	
22:5(n-6)	1,30 ± 0,05	0,81 ± 0,03	0,862 ± 0,216	0,086 ± 0,021
22:5(n-3)	0,15 ± 0,01	0,56 ± 0,026	0,104 ± 0,035	0,060 ± 0,020
DHA	9,35 ± 0,23	6,36 ± 0,15	6,208 ± 1,653	0,676 ± 0,180
Tot. SAT.	25,24 ± 0,40	33,61 ± 0,53	16,866 ± 5,139	3,574 ± 1,089
Tot. MONO.	32,32 ± 1,22	21,77 ± 0,82	21,427 ± 5,422	2,315 ± 0,586
Tot. (n-9)	6,86 ± 0,28	8,87 ± 0,36	4,546 ± 1,138	0,943 ± 0,236
Tot. (n-7)	25,38 ± 0,94	12,68 ± 0,47	16,825 ± 4,269	1,348 ± 0,342
Tot. POLI.	42,43 ± 0,82	44,62 ± 0,87	28,365 ± 8,738	4,744 ± 1,461
Tot. (n-6)	11,90 ± 0,25	11,67 ± 0,25	7,958 ± 2,465	1,241 ± 0,384
Tot. (n-3)	30,07 ± 0,57	32,30 ± 0,62	20,101 ± 6,186	3,434 ± 1,057
n-3/n-6			2,5	2,8
Tot. ng x Lv ⁻¹			66,658 ± 19,300	10,633 ± 3,078

1.1.5.- Postlarva (22-28 Días)**1.1.5.1.- Lípidos Polares**

Tabla LIV: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

22-28 días LP		CULTIVOS BUENOS		
Ácidos Grasos	%		ng post-larva ⁻¹	
	1 (28 días) Media ± SD	2 (22 días) Media ± SD	1 (28 días) Media ± SD	2 (22 días) Media ± SD
14:0	2,74 ± 0,06	1,93 ± 0,51	0,429 ± 0,040	0,965 ± 0,116
16:0	29,08 ± 0,14	20,66 ± 2,55	4,543 ± 0,301	10,429 ± 0,229
18:0	13,09 ± 0,84	11,71 ± 1,07	2,050 ± 0,277	5,924 ± 0,322
16:1(n-7)	1,43 ± 0,00	1,49 ± 0,08	0,223 ± 0,016	0,763 ± 0,150
18:1(n-9)	5,33 ± 0,04	4,90 ± 0,48	0,834 ± 0,066	2,476 ± 0,116
18:1(n-7)	3,42 ± 0,85	4,34 ± 0,28	0,530 ± 0,095	2,218 ± 0,183
20:1(n-11)	1,04 ± 0,30	1,08 ± 0,00	0,165 ± 0,059	0,553 ± 0,081
20:1(n-9)	2,51 ± 0,33	2,25 ± 0,10	0,390 ± 0,024	1,141 ± 0,114
20:1(n-7)	2,39 ± 0,17	0,98 ± 0,02	0,373 ± 0,000	0,497 ± 0,062
18:2(n-6)	1,19 ± 0,22	1,44 ± 0,09	0,184 ± 0,021	0,731 ± 0,059
18:2(n-4)	0,40 ± 0,06	0,24 ± 0,03	0,062 ± 0,006	0,120 ± 0,000
18:3(n-6)	0,20 ± 0,00	0,41 ± 0,06	0,032 ± 0,003	0,207 ± 0,002
18:3(n-3)	2,15 ± 0,56	1,89 ± 0,36	0,333 ± 0,064	0,975 ± 0,321
18:4(n-3)	1,04 ± 0,22	1,02 ± 0,31	0,162 ± 0,023	0,529 ± 0,233
20:2(n-6)	3,27 ± 0,40	3,76 ± 0,58	0,509 ± 0,026	1,936 ± 0,572
20:3(n-6)	0,25 ± 0,04	0,46 ± 0,09	0,040 ± 0,009	0,235 ± 0,078
ARA	1,66 ± 0,42	4,42 ± 0,18	0,257 ± 0,047	2,257 ± 0,420
20:4(n-3)	0,39 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,061 ± 0,008	0,189 ± 0,053
EPA	4,55 ± 1,11	7,23 ± 1,16	0,717 ± 0,223	3,725 ± 1,124
21:4(n-6)	0,61 ± 0,28	1,54 ± 0,62	0,095 ± 0,037	0,761 ± 0,202
21:5(n-3)	1,99 ± 0,09	4,32 ± 1,17	0,310 ± 0,008	2,243 ± 0,913
22:4(n-6)		3,28 ± 0,28		1,680 ± 0,383
22:5(n-6)	4,09 ± 0,49	3,76 ± 0,38	0,637 ± 0,032	1,931 ± 0,473
22:5(n-3)	0,67 ± 0,21	1,41 ± 0,04	0,103 ± 0,025	0,719 ± 0,084
DHA	16,52 ± 2,03	15,09 ± 1,23	2,592 ± 0,501	7,731 ± 1,743
Tot. SAT.	44,91 ± 0,77	34,30 ± 4,13	7,022 ± 0,618	17,318 ± 0,435
Tot. MONO.	16,12 ± 1,01	15,07 ± 0,80	2,515 ± 0,021	7,648 ± 0,706
Tot. (n-9)	7,84 ± 0,29	7,14 ± 0,59	1,224 ± 0,042	3,617 ± 0,230
Tot. (n-7)	7,24 ± 1,02	6,84 ± 0,22	1,126 ± 0,079	3,478 ± 0,395
Tot. POLI.	38,97 ± 0,24	50,63 ± 4,93	6,094 ± 0,470	25,969 ± 6,252
Tot. (n-6)	11,27 ± 1,77	19,07 ± 0,73	1,754 ± 0,152	9,738 ± 1,781
Tot. (n-3)	27,30 ± 2,08	31,32 ± 4,23	4,278 ± 0,628	16,111 ± 4,470
n-3/n-6			2,4	1,7
Tot. ng x Postlv ⁻¹			15,631 ± 1,109	50,935 ± 7,392

1.1.5.2.- Lípidos Neutros

Tabla LV: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng larva⁻¹) para dos cultivos buenos (1 y 2). Valores medios y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas (n=3).

22-28 días LN		CULTIVOS BUENOS		
Ácidos Grasos	%		ng post-larva ⁻¹	
	1 (28 días) Media ± SD	2 (22 días) Media ± SD	1 (28 días) Media ± SD	2 (22 días) Media ± SD
14:0	6,86 ± 0,69	10,81 ± 1,09	0,902 ± 0,128	2,522 ± 0,358
16:0	13,13 ± 0,03	16,97 ± 0,04	1,726 ± 0,067	3,952 ± 0,154
18:0	5,61 ± 0,14	6,96 ± 0,17	0,737 ± 0,013	1,620 ± 0,028
16:1(n-7)	5,05 ± 0,23	4,59 ± 0,21	0,663 ± 0,003	1,068 ± 0,005
18:1(n-9)	10,30 ± 0,37	3,87 ± 0,14	1,354 ± 0,007	0,902 ± 0,005
18:1(n-7)	6,23 ± 0,39	3,87 ± 0,24	0,819 ± 0,017	0,901 ± 0,018
20:1(n-11)	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,014 ± 0,004	0,035 ± 0,011
20:1(n-9)	3,10 ± 0,27	0,94 ± 0,08	0,407 ± 0,018	0,218 ± 0,010
20:1(n-7)	0,86 ± 0,097	0,50 ± 0,06	0,113 ± 0,008	0,117 ± 0,008
18:2(n-6)	6,06 ± 2,94	4,14 ± 2,01	0,797 ± 0,415	0,974 ± 0,507
18:2(n-4)	0,45 ± 0,17	0,39 ± 0,15	0,059 ± 0,021	0,089 ± 0,031
18:3(n-6)	0,18 ± 0,025	0,40 ± 0,06	0,023 ± 0,002	0,093 ± 0,009
18:3(n-3)	7,63 ± 0,46	1,98 ± 0,12	1,003 ± 0,020	0,462 ± 0,009
18:4(n-3)	7,99 ± 0,78	1,61 ± 0,16	1,050 ± 0,059	0,374 ± 0,021
20:2(n-6)	3,62 ± 1,38	2,87 ± 1,09	0,476 ± 0,199	0,673 ± 0,281
20:3(n-6)	0,50 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,066 ± 0,008	0,048 ± 0,006
ARA	1,97 ± 0,35	1,66 ± 0,30	0,259 ± 0,036	0,384 ± 0,054
20:4(n-3)	0,57 ± 0,02	3,70 ± 0,15	0,075 ± 0,000	0,861 ± 0,000
EPA	5,81 ± 0,24	4,37 ± 0,18	0,764 ± 0,000	1,018 ± 0,000
21:4(n-6)		1,65 ± 0,03		0,384 ± 0,023
21:5(n-3)	0,88 ± 0,04	4,01 ± 0,16	0,115 ± 0,000	0,933 ± 0,000
22:4(n-6)		3,39 ± 0,10		0,789 ± 0,010
22:5(n-6)	1,64 ± 0,22	4,61 ± 0,62	0,216 ± 0,020	1,072 ± 0,101
22:5(n-3)	0,52 ± 0,007	7,13 ± 0,10	0,068 ± 0,002	1,661 ± 0,045
DHA	10,92 ± 1,48	9,23 ± 1,25	1,435 ± 0,135	2,143 ± 0,202
Tot. SAT.	25,61 ± 0,66	34,73 ± 0,89	3,365 ± 0,224	8,094 ± 0,540
Tot. MONO.	25,64 ± 1,27	13,92 ± 0,69	3,370 ± 0,028	3,241 ± 0,026
Tot. (n-9)	13,40 ± 0,61	4,81 ± 0,22	1,761 ± 0,008	1,120 ± 0,005
Tot. (n-7)	12,14 ± 0,69	8,97 ± 0,51	1,595 ± 0,025	2,086 ± 0,032
Tot. POLI.	48,75 ± 0,19	51,34 ± 0,20	6,406 ± 0,239	11,958 ± 0,445
Tot. (n-6)	13,98 ± 1,529	18,92 ± 2,07	1,837 ± 0,276	4,417 ± 0,663
Tot. (n-3)	34,32 ± 2,27	32,04 ± 2,12	4,510 ± 0,113	7,452 ± 0,187
n-3/n-6			2,5	1,7
Tot. ng x Postlv ⁻¹			13,141 ± 0,541	23,293 ± 0,958

1.2.- VIEIRA**1.2.1.- Lípidos Polares**

Tabla LVI: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng individuo⁻¹).

LP	OVOCITO-POSTLARVA (23 DÍAS)											
	Ovocito		Larva D		5 días		9 días		19 días		23 días	
Ácidos Grasos	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹
14:0	2,3	0,026	2,0	0,030	3,2	0,037	4,0	0,106	3,2	0,159	3,7	0,201
16:0	14,5	0,166	14,2	0,216	14,4	0,165	14,5	0,384	14,1	0,696	13,5	0,731
18:0	9,7	0,111	9,8	0,148	10,8	0,123	9,5	0,251	10,0	0,495	11,4	0,618
16:1(n-7)	2,2	0,025	3,0	0,045	3,7	0,042	3,5	0,092	2,6	0,127	2,6	0,139
18:1(n-9)	2,6	0,030	2,8	0,043	2,8	0,032	3,8	0,100	5,1	0,251	4,7	0,255
18:1(n-7)	2,8	0,032	4,2	0,064	5,3	0,061	6,7	0,177	6,1	0,302	6,0	0,327
20:1(n-11)	0,2	0,002	0,4	0,006	0,7	0,008	0,5	0,013	0,5	0,025	0,5	0,026
20:1(n-9)	1,3	0,015	1,8	0,028	2,2	0,025	2,0	0,052	2,3	0,113	2,3	0,126
20:1(n-7)	0,4	0,004	0,9	0,014	1,0	0,012	1,0	0,026	0,7	0,036	0,7	0,039
18:2(n-6)	1,8	0,021	1,8	0,028	1,3	0,015	3,3	0,086	2,4	0,118	3,3	0,181
18:2(n-4)	0,3	0,003	0,4	0,006	0,3	0,003	0,2	0,005	0,2	0,010	0,4	0,019
18:3(n-6)	0,2	0,002	0,3	0,004	0,4	0,005	0,5	0,014	0,4	0,019	0,4	0,023
18:3(n-3)	0,9	0,010	0,7	0,015	0,9	0,010	1,5	0,040	1,7	0,086	1,6	0,087
18:4(n-3)	2,1	0,024	1,6	0,024	1,7	0,020	2,1	0,055	3,2	0,160	2,8	0,151
20:2(n-6)	0,4	0,004	0,5	0,008	0,5	0,006	0,7	0,018				
20:3(n-6)	0,3	0,003	0,4	0,006	0,4	0,005	0,4	0,010	0,4	0,018	0,4	0,021
ARA	5,3	0,061	4,0	0,078	4,1	0,047	3,0	0,078	2,1	0,104	2,0	0,109
20:4(n-3)	0,1	0,001	0,1	0,002	0,1	0,001	0,1	0,002		0,002	0,2	0,009
EPA	20,3	0,232	17,0	0,258	12,1	0,138	12,5	0,330	12,4	0,611	10,8	0,586
21:4(n-6)	0,6	0,007			0,6	0,007	0,4	0,010	0,4	0,022	0,7	0,036
21:5(n-3)	0,8	0,009	0,8	0,012	0,7	0,008	0,5	0,013	0,6	0,031	0,5	0,029
22:4(n-6)	0,5	0,006	0,7	0,011	0,8	0,009	0,4	0,011		0,002	0,2	0,012
22:5(n-6)	3,6	0,041	3,6	0,054	4,3	0,049	4,8	0,126	5,4	0,266	5,3	0,290
22:5(n-3)	1,1	0,013	1,3	0,020	1,1	0,013	0,6	0,017	0,5	0,027	0,6	0,032
DHA	25,7	0,294	26,2	0,397	26,4	0,302	23,8	0,628	25,4	1,252	25,4	1,379
Tot. SAT.	26,5	0,303	26,0	0,394	28,4	0,325	28,0	0,741	27,4	1,350	28,6	1,550
Tot. MONO.	9,5	0,108	13,2	0,200	15,7	0,180	17,5	0,460	17,3	0,854	16,8	0,912
Tot. (n-9)	3,9	0,045	4,7	0,071	5,0	0,057	5,8	0,152	7,4	0,364	7,0	0,381
Tot. (n-7)	5,3	0,061	8,1	0,123	10,0	0,115	11,2	0,295	9,4	0,465	9,3	0,505
Tot. POLI.	64,0	0,731	60,8	0,923	55,7	0,638	54,8	1,443	55,3	2,728	54,6	2,964
Tot. (n-6)	12,7	0,145	12,5	0,189	12,6	0,143	13,5	0,353	11,1	0,549	12,4	0,672
Tot. (n-3)	51,1	0,583	48,0	0,728	43,0	0,492	41,1	1,085	44,0	2,169	41,9	2,273
n-3/n-6		4,0		3,85		3,44		3,07		3,95		3,38
Tot. ng indiv ⁻¹		1,142		1,517		1,143		2,644		4,932		5,426

1.2.2.- Lípidos Neutros

Tabla LVII: Composición porcentual (expresado en % por ácidos grasos mayoritarios) y cuantitativa (expresada en ng individuo⁻¹).

LN	OVOCITO-POSTLARVA (23 DÍAS)											
Ácidos Grasos	Ovocito		Larva D		5 días		9 días		19 días		23 días	
	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹	%	ng ind ⁻¹
14:0	6,1	0,285	6,2	0,202	3,6	0,022	13,2	0,485	12,1	1,891	11,2	1,801
16:0	20,9	0,968	21,4	0,699	21,6	0,130	16,5	0,605	15,2	2,372	13,6	2,185
18:0	4,0	0,186	4,6	0,149	7,1	0,043	2,8	0,101	2,3	0,358	2,1	0,345
16:1(n-7)	10,4	0,484	10,2	0,332	7,6	0,046	9,1	0,335	7,8	1,224	8,3	1,331
18:1(n-9)	6,3	0,293	6,1	0,198	6,6	0,040	5,5	0,200	8,2	1,282	8,2	1,315
18:1(n-7)	6,6	0,306	6,8	0,221	8,8	0,053	8,5	0,311	6,9	1,086	7,2	1,161
20:1(n-11)	0,3	0,012	0,2	0,006	0,5	0,003	0,1	0,003	0,1	0,014	0,1	0,010
20:1(n-9)	0,6	0,029	0,8	0,026	1,3	0,008	0,5	0,019	0,7	0,102	0,6	0,099
20:1(n-7)	0,5	0,025	0,2	0,005	1,2	0,007	0,3	0,010	0,3	0,040	0,2	0,040
18:2(n-6)	3,6	0,168	3,4	0,112	3,3	0,020	6,2	0,228	6,2	0,971	7,4	1,199
18:2(n-4)	1,0	0,045	0,9	0,028	0,7	0,004	0,5	0,017	0,4	0,068	0,6	0,090
18:3(n-6)	0,6	0,030	0,6	0,020	0,7	0,004	1,0	0,036	1,0	0,156	1,3	0,209
18:3(n-3)	2,2	0,103	2,1	0,067	2,0	0,012	3,4	0,126	4,6	0,715	5,1	0,822
18:4(n-3)	4,6	0,213	4,2	0,136	4,1	0,025	4,9	0,178	9,4	1,465	9,3	1,504
20:2(n-6)	0,5	0,025	0,6	0,021	0,8	0,005	0,5	0,017				
20:3(n-6)	0,4	0,017	0,5	0,015	0,5	0,003	0,2	0,008	0,2	0,030	0,2	0,032
ARA	1,4	0,066	1,7	0,055	2,0	0,012	1,0	0,037	0,6	0,091	0,6	0,090
20:4(n-3)	0,6	0,027	1,0	0,033	0,3	0,002	0,1	0,002	0,1	0,013	0,2	0,035
EPA	19,6	0,909	17,4	0,569	15,1	0,091	12,4	0,456	11,5	1,794	11,3	1,812
21:4(n-6)	0,2	0,011	0,3	0,011	0,5	0,003	0,1	0,005	0,2	0,030	0,3	0,046
21:5(n-3)	0,6	0,028	0,7	0,022	0,5	0,003	0,3	0,012	0,4	0,060	0,4	0,061
22:4(n-6)	0,2	0,011	0,5	0,016	0,2	0,001	0,1	0,002		0,006		0,008
22:5(n-6)	0,8	0,038	1,0	0,032	1,5	0,009	1,8	0,067	1,7	0,269	1,8	0,284
22:5(n-3)	0,4	0,017	0,5	0,015	0,3	0,002	0,1	0,005	0,1	0,021	0,2	0,028
DHA	7,4	0,342	8,4	0,273	9,1	0,055	11,0	0,403	10,2	1,590	9,9	1,595
Tot. SAT.	31,0	1,439	32,2	1,050	32,3	0,195	32,5	1,191	29,5	4,621	26,9	4,331
Tot. MONO.	24,8	1,149	24,1	0,788	33,1	0,157	24,0	0,878	24,0	3,748	24,6	3,956
Tot. (n-9)	6,9	0,322	6,9	0,224	7,9	0,048	6,0	0,219	8,8	1,384	8,8	1,414
Tot. (n-7)	17,6	0,815	17,1	0,558	17,6	0,106	17,9	0,656	15,0	2,350	15,7	2,532
Tot. POLI.	44,2	2,050	43,7	1,425	41,6	0,251	43,6	1,599	46,5	7,279	48,5	7,815
Tot. (n-6)	7,9	0,366	8,6	0,282	9,5	0,057	10,9	0,400	9,9	1,553	11,6	1,868
Tot. (n-3)	35,3	1,639	34,2	1,115	31,4	0,190	32,2	1,182	36,2	5,658	36,4	5,857
n-3/n-6		4,5		4,0		3,33		2,96		1,94		3,14
Tot. ng indiv ⁻¹		4,638		3,263		0,603		3,668		15,648		16,102

2.- PUBLICACIÓN

Journal of Shellfish Research, Vol. 21, No. 2, 649–658, 2002.

INGESTION, DIGESTION, AND ASSIMILATION OF GELATIN-ACACIA MICROCAPSULES INCORPORATING DEUTERIUM-LABELED ARACHIDONIC ACID BY LARVAE OF THE CLAM *VENERUPIS PULLASTRA*

S. NOVOA,¹ D. MARTÍNEZ,¹ J. OJEA,¹ P. SOUDANT,² J.-F. SAMAIN,³ J. MOAL,³ AND J.-L. RODRÍGUEZ^{4,*}

¹Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, CIMA. Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura, Muelle de Porcillán s/n 27700 Ribadeo, Spain; ²Université de Bretagne Occidentale, IUEM, UMR 6539 LEMAR, Technopole Brest-Iroise, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France; ³DRV/A, Laboratoire LPI, IFREMER Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France; and ⁴Departamento de Bioquímica y Biol. Mol., Facultad de Veterinaria, campus univ. s/n, 27002 Lugo, Spain

ABSTRACT Olive oil gelatin-acacia microcapsules (GAMs) enriched with deuterium-labeled arachidonic acid (*AA) were prepared and fed to *Venerupis pullastra* larvae. In a first experiment, larvae were either starved or fed these microcapsules (*AA-GAM) for 12 h. The *AA-GAM-fed larvae incorporated *AA and oleic acid (OA) in their neutral and polar lipids. The incorporation yield was around 5% for *AA in neutral and polar lipids and 2% and 1% for OA in neutral and polar lipids, respectively. In a second experiment, larvae were fed for 7 days with a mixed algal diet supplemented with or without *AA-GAM. The microcapsules were ingested and digested without any harmful effect on larvae. OA was incorporated preferentially in neutral lipids whereas *AA was equally distributed in neutral and polar lipids. The incorporation yield was higher in the second experiment probably in relation to the presence of algae. However, the incorporation rate of both tracer fatty acids decreased with time in both lipid classes. *AA dropped from 16–2% in both neutral and polar lipids and OA decreased more rapidly in polar (16–3%) than in neutral lipids (33–15%). These changes in the incorporation yield could correspond to the growth slowing down at the approach of the metamorphosis or to a saturation in the levels of fatty acids because the percentage of natural arachidonic acid stayed stable in neutral lipids or tended to decrease in polar lipids. The easy fabrication and use of GAM associated to the direct measurement of a deuterated fatty acid by gas chromatography is a promising tool for studying lipid metabolism in mollusks.

KEY WORDS: clam, *Venerupis pullastra*, nutrition, microcapsules, larva, fatty acids

INTRODUCTION

The production of living microalgae (LMA) as food for the larvae and spat of bivalves in commercial hatcheries accounts for approximately 30% of operating costs (Coutteau & Sorgeloos 1992). Because of the high cost and unpredictability of the algal culture, the development of artificial diets for bivalve mollusks was attempted by several investigators (Jones et al. 1974). Microcapsules of the cross-linked protein-walled type were used to examine aspects of protein (Langdon & Siegfried 1984) and carbohydrate (Kreeger et al. 1996) metabolism of bivalves and gelatin-acacia microcapsules were investigated in lipid nutrition (Langdon & Waldock 1981, Chu et al. 1987, Numaguchi & Nell 1991, Knauer & Southgate 1997a, 1997b). Some potential alternatives, such as dried microalgae, microalgal pastes, lipid emulsions, and microcapsulated or yeast-based artificial diets (for revision, see Coutteau & Sorgeloos 1993; Robert & Trintignac 1997), have shown promising results. The total or partial substitution of microalgae by artificial particles has been proposed, where, ideally, nutritional requirements of bivalves should be satisfied using diets whose composition could be precisely controlled. The gelatin-acacia microcapsules (GAMs) are not a suitable vehicle to deliver complete artificial diets to the larvae of bivalves because only water-insoluble nutrients can be encapsulated using this method. However, they may be a useful tool in studies addressing aspects of the lipid nutrition in addition to being a supplement for mixed microalgal diets poor in some essential fatty acids. GAM could be a useful supplement if sufficient quantities of LMA were unavail-

able to feed spat (Numaguchi & Nell 1991). GAMs are simple to produce, relatively easy to use, and can be prepared rapidly on demand. However, the potential of GAM as a substitute for LMA under large-scale culture conditions must still be assessed (Knauer & Southgate 1997a). A number of studies have been undertaken to prove GAM ingestion, digestion, and assimilation and have shown that GAM were readily digested by bivalves (Chu et al. 1982, Southgate 1988) and that the lipids supplied were assimilated with high efficiency (Knauer & Southgate 1997c). The data generated in such studies will facilitate the further development of suitable artificial diets for the larvae of marine bivalves. The knowledge of the nutritional requirements of the larvae of cultured bivalves is necessary to improve the efficiency of algal diets used in hatcheries and to design convenient artificial diets. Previous studies pointed out the energetic role of lipids during the larval development of mollusks (Holland 1978), as well as the changes in the composition of the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) occurring in neutral and polar lipids during embryogenesis. This nutritional transition suggests that a metabolic control takes place in developing larvae (Marty et al. 1992). It is probable that this control results from a selective incorporation of dietary fatty acids by acyltransferases, indicating a preferential incorporation of long-chain PUFA, especially the 22:6(n-3) in the case of the larval development of *Pecten maximus* (Marty et al. 1992). This study was proposed as an attempt to confirm the assimilation of the fatty acids incorporated in GAM and their bioconversion in endogenous fatty acids of neutral and polar lipids in the larvae of marine bivalves. The data generated could indicate whether GAM could serve as a tool in studies of lipid metabolism in marine bivalves as well as demonstrate their use as a nutritional supplement in mixed microalgal-microcapsulated diets.

*Corresponding author. E-mail address: jrodri@lugo.usc.es

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Lipid Standards and Reagents

Deuterium-labeled arachidonic acid (FA-503 arachidonic acid-5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15- d_8) was obtained from BIOMOL Research Laboratory, Inc. (Plymouth Meeting, PA). Identification and quantification were based on standard fatty acid methyl ester mixture (Sigma-Aldrich, Chemical Spain). Internal standard, Tricosanoic acid (C23:0), was purchased from Nu-Chek-Prep. Butylated hydroxytoluene (BHT) and fluorescein isothiocyanate (FITC) were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and sodium hydrogen bicarbonate was from Merck (Darmstadt, Germany).

Solvents

Hexane, chloroform, and methanol were high-performance liquid chromatography (HPLC) grade from Merck (Darmstadt, Germany). Boron trifluoride (10%, w/w) in methanol (BF_3) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA).

Fabrication of GAMs

Two different sets of GAM were fabricated following a modified method described by Rodríguez et al. (1992).

FITC-GAM

GAMs were prepared with 500 μ L of cod liver oil and by later addition of FITC. Briefly, 500 μ L of cod liver oil was homogenized with antioxidant BHT (5%, w/v). Then, 500 mL of cod liver oil plus antioxidant was emulsified with a 1:1 mixture of a 2% (w/v) solution of gelatin and a 2% (w/v) solution of acacia, which had been made up separately in distilled water. The emulsion was stirred in a Virtis Tempest IQ² blade homogenator programmed at 30,000 rpm for 2 min. The pH of the mixture was reduced until the coagulation pH (4.3), by the drop-by-drop addition of dilute HCl. The mixture was stirred for 40 min and pH was then raised to 9.3 by the addition of dilute NaOH. The resulting GAM suspension



Figure 1. Larva of *V. pullastra* observed under fluorescence microscopy. Accumulation of yellow fluorescence indicates ingestion of microcapsules. (Author: J.-L. Rodríguez)

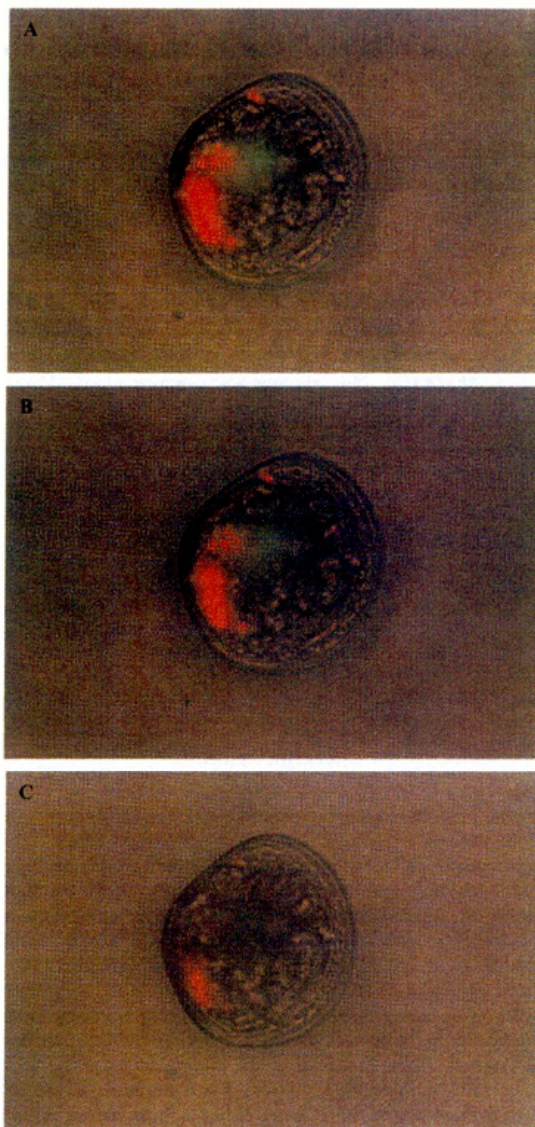


Figure 2. Digestion of microcapsules throughout a period of 20 min. Sequence A–C shows the disappearance of the yellow fluorescence inside a larva of *V. pullastra*. (Author: J.-L. Rodríguez)

was poured into 500 mL of cold distilled water and kept in a refrigerator for 2 h. Previously a solution of FITC 0.25% (w/v) in 100 mM sodium hydrogen bicarbonate ($NaHCO_3$) was prepared. Two milliliters of stock microcapsules were incubated at 4°C for 12 h with 0.5 mL of FITC solution diluted with 2.5 mL of 100 mM $NaHCO_3$ solution. The mean diameter of FITC-GAM was $4.0 \pm 1.0 \mu m$ ($n = 100$). Two milliliters of FITC-GAM was used to feed a batch of 23-day-old *Venerupis pullastra* larvae and subsequently were observed under fluorescent microscopy.

INGESTION, DIGESTION, AND ASSIMILATION OF GAM

651

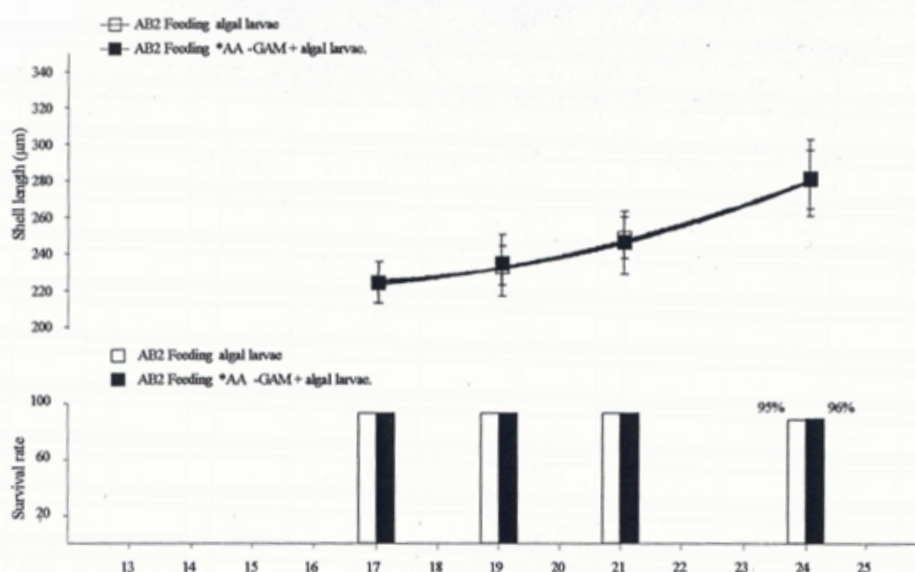


Figure 3. Shell length (μm) of the AB2 batch, fed with algal (open squares) and *AA-GAM + algal (solid squares). Survival rate (%) of the same batch fed with algal (open bars) and with *AA-GAM + algal (solid bars). Results are expressed in μm (%); Mean \pm SD, $n = 100$.

Deuterated Arachidonic Acid (*AA)-GAM

GAMs were prepared with olive oil supplemented with deuterium-labeled arachidonic acid. Briefly, 50 μL of olive oil was homogenized with 5 mg of deuterium-labeled arachidonic acid and antioxidant BHT (5%, w/v). Deuterated *AA-GAM was obtained following the method previously described. The resulting GAM suspension was poured into 250 mL of cold distilled water and held in a refrigerator for 2 h. The mean diameter of *AA-GAM was $3.5 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ($n = 100$) and the stock suspension of GAM was kept at 4°C and shaken daily.

Feeding Experiments

A population of *V. pullastra* D-larvae termed AB2 was selected by its good growth and survival rates and distributed in 500-L tanks at a density of 5 larvae mL^{-1} . Larvae were fed daily with a microalgal mixture of *Pavlova lutheri* (Droop), *Isochrysis aff. galbana* Green (clone T-iso; Tahiti *Isochrysis*), *Skeletonema costatum* (Greville), and *Chaetoceros calcitrans* (Tanaka) at a density of 15/15/15/15 cells μL^{-1} .

Experiment 1

Larvae 14 days of age from the AB2 culture were collected and transferred at the same density into two 6-L flasks for a 24-h experiment. One batch was starved whereas the other was fed with 60 $\mu\text{cap} \mu\text{L}^{-1}$ *AA-GAM. *AA-GAM-fed larvae had seawater renewed 12 h after feeding, and no food was supplied then. Twelve hours later, both fed and starved larvae were collected on a 45- μm mesh.

Experiment 2

Larvae 17 days of age from the same AB2 culture were distributed in two 150-L tanks at a density of 4 larvae mL^{-1} and fed

daily with two different diets for 7 days, either a microalgal diet of *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *S. costatum*, *C. calcitrans*, and *Tetraselmis suecica* (Butcher) at a density of 20/20/15/15/10 cells μL^{-1} or a diet consisting of the same microalgal mixture supplemented with 5 $\mu\text{cap} \mu\text{L}^{-1}$ *AA-GAM.

Samples for Fatty Acid Analyses

Larvae from the 24-h experience were collected as indicated above. Larvae from the 7-day experience that were 18, 19, 21, and 24 days of age were collected 4 h after feeding on a 45- μm mesh ($n = 1$).

All larval samples were crushed and stored in a CHCl_3 -MeOH mixture (2:1, v/v) under nitrogen at -30°C until fatty acid analysis could be performed. Samples of microalgal mixture ($n = 3$) and microcapsules ($n = 3$) were filtered on GF/F (Whatman) glass fiber filters and stored similar to larvae before analysis.

Fatty Acid Analysis

The separation of the polar and neutral lipids was performed by micro-column liquid chromatography as described by Marty et al. (1992). Total lipids were evaporated to dryness and dissolved three times using 500 μL of chloroform/methanol (98:2). Neutral and polar lipids were separated on a silica gel 6% (w/w) hydrated microcolumn (30 \times 5 mm) using chloroform/methanol (98:2) and methanol successively as eluting solvents. The fractions were collected under nitrogen in screw-capped flasks containing a known amount of 23:0 as internal standard for quantitative determinations. Fatty acid composition and quantification of polar and neutral lipids were determined using gas chromatography (CG), after purification of fatty acid methyl esters (FAMES) by HPLC. FAMES from the neutral and polar lipid fractions were transes-

terified with 10% (w/w) BF₃ in methanol (Metcalf and Schmitz 1961) for 10 min at 100°C. After cooling, FAMES were extracted with hexane. The organic phase was evaporated under nitrogen and dissolved in chloroform/methanol (98:2) for purification by HPLC (Hennion et al. 1983, modified). FAMES present in each lipid fraction were injected in a CG System HP6890 series equipped with a split/splitless injector, a flame ionization detector, and a DBWAX capillary column (30 m × 0.25 mm ID; 0.2-μm film thickness). The carrier gas was H₂, at an initial pressure of 80 kPa. The oven was programmed to stay at the initial temperature of 60°C for 2 min, rise from 60 to 160°C at a rate of 50°C/min, stay for 2 min and from 160 to 170°C at 1.5°C/min, then 170–185°C at 2°C/min, next 185–240°C at 3°C/min, and finally remain at 240°C for 10 min. Injector and detector temperatures were 230°C and 250°C, respectively. The flow rates of compressed air, hydrogen and make up gas (nitrogen) were 300, 30, and 20 mL·min⁻¹, respectively. Fatty acids were identified by comparison of their retention times with those of standards. The C:X (n-Y) notation was adopted, where C was the number of carbons, X the number of double bonds, and n-Y the position of the first double bond from the terminal methyl group.

TABLE 1.

Fatty acid composition of the deuterium-labeled microcapsules (*AA-GAM).

Fatty Acid	*AA-GAM (%)		*AA-GAM (ng/larvae)	
	Mean	SD	Mean	SD
14:0	0.061	0.003	0.028	0.002
16:0	10.830	0.066	4.920	0.583
18:0	2.606	0.075	1.182	0.118
20:0	0.390	0.024	0.176	0.011
22:0	0.131	0.007	0.059	0.004
24:0	0.073	0.027	0.032	0.009
16:1 (n-9)	0.171	0.018	0.077	0.002
16:1 (n-7)	0.872	0.036	0.395	0.033
18:1 (n-9)	65.691	0.310	29.863	3.804
18:1 (n-7)	2.481	0.493	1.145	0.371
20:1 (n-9)	0.326	0.019	0.147	0.010
18:2 (n-6)	10.056	0.333	4.564	0.497
18:2 (n-4)	0.000	0.000	0.000	0.000
18:3 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
18:3 (n-3)	0.749	0.029	0.339	0.028
18:4 (n-3)	0.000	0.000	0.000	0.000
20:2 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
20:3 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
20:4 (n-6)-d ₈	5.363	0.238	2.428	0.192
20:4 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
20:4 (n-3)	0.000	0.000	0.000	0.000
20:5 (n-3)	0.000	0.000	0.000	0.000
22:4 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
22:5 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
22:5 (n-3)	0.000	0.000	0.000	0.000
22:6 (n-3)	0.076	0.012	0.034	0.003
TO.SAT.	14.215	0.208	6.453	0.711
TO.MONO	69.541	0.728	31.627	4.210
TO.POLY	16.244	0.520	7.366	0.711
(n-3)/(n-6)	0.053	0.001	0.002	0.000
ng/larvae			45.446	5.613

Values in bold are, respectively, the major fatty acid present in olive oil [18:1 (n-9)] and the deuterium-labeled arachidonic acid added [20:4 (n-6)-d₈]. Results are expressed in percentages (%) and in ng supplied to each larva (ng/larvae) in experiment 1. Values are means ± SD (n = 3).

Incorporation yield was calculated using the following equation:

$$\text{incorporation \%} = \frac{(\text{AA-GAM}_n - \text{algae}_n) \text{ ng FA} \times \text{larvae}^{-1}}{(\text{AA-GAM} - \text{algae}) \text{ ng dietary FA} \times \text{larvae}^{-1}} \times 100$$

where the numerator is equal to fatty acid difference between larvae fed the microcapsules + algae and larvae starved or fed the algae and the denominator is the fatty acid supplied by the microcapsules.

RESULTS

Ingestion and Digestion of Microcapsules

After feeding on FITC-GAM for 4 h, larvae were observed under fluorescent microscopy. The ingestion of FITC-GAM was

TABLE 2.

Fatty acid composition of the diets supplied in experiment 2: algal diet (mixed microalgae only) and *AA-GAM + algal diet (mixed microalgae supplemented with microcapsules).

Fatty Acids	Algal Diet (ng/larvae)		*AA-GAM + Algal Diet (ng/larvae)	
	Mean	SD	Mean	SD
14:0	15.220	1.520	15.223	1.520
16:0	14.105	1.670	14.590	1.721
18:0	0.694	0.290	0.811	0.300
20:0	0.189	0.245	0.207	0.244
22:0	0.109	0.014	0.115	0.014
24:0	0.122	0.046	0.125	0.047
			0.000	
16:1 (n-9)	0.181	0.029	0.188	0.030
16:1 (n-7)	19.401	1.695	19.440	1.698
18:1 (n-9)	7.766	0.648	10.710	0.997
18:1 (n-7)	1.289	0.142	1.401	0.175
20:1 (n-9)	0.083	0.012	0.097	0.012
			0.000	
16:2 (n-7)	2.356	0.236	2.356	0.236
16:2 (n-4)	0.692	0.045	0.692	0.045
16:3 (n-6)	0.000	0.000	0.000	0.000
16:3 (n-4)	0.964	0.137	0.964	0.137
18:2 (n-6)	4.376	0.308	5.326	0.345
18:2 (n-4)	0.216	0.029	0.216	0.029
18:3 (n-6)	0.623	0.040	0.623	0.040
18:3 (n-3)	5.152	0.354	5.185	0.357
18:4 (n-3)	6.767	0.575	6.767	0.575
18:5 (n-3)	1.663	0.146	1.663	0.146
20:2 (n-6)	0.048	0.027	0.048	0.027
20:3 (n-6)	0.074	0.007	0.074	0.007
20:4 (n-6)-d ₈	0.000	0.000	0.239	0.019
20:4 (n-6)	1.407	0.095	1.407	0.095
20:4 (n-3)	0.052	0.007	0.052	0.007
20:5 (n-3)	4.015	0.155	4.015	0.155
22:4 (n-6)	0.043	0.008	0.043	0.008
22:5 (n-6)	0.964	0.007	0.964	0.007
22:5 (n-3)	0.105	0.032	0.105	0.032
22:6 (n-3)	6.047	0.145	6.050	0.145
TO.SAT.	30.975	3.403	31.611	3.461
TO.MONO	29.582	2.470	32.701	2.846
TO.POLY	37.027	1.979	37.753	2.034
ng. Diet/larvae	98.304	8.358	102.785	8.845

Values in bold are, respectively, the major fatty acid present in olive oil [18:1 (n-9)] and the deuterium-labeled arachidonic acid added [20:4 (n-6)-d₈]. Data are means ± SD (n = 3).

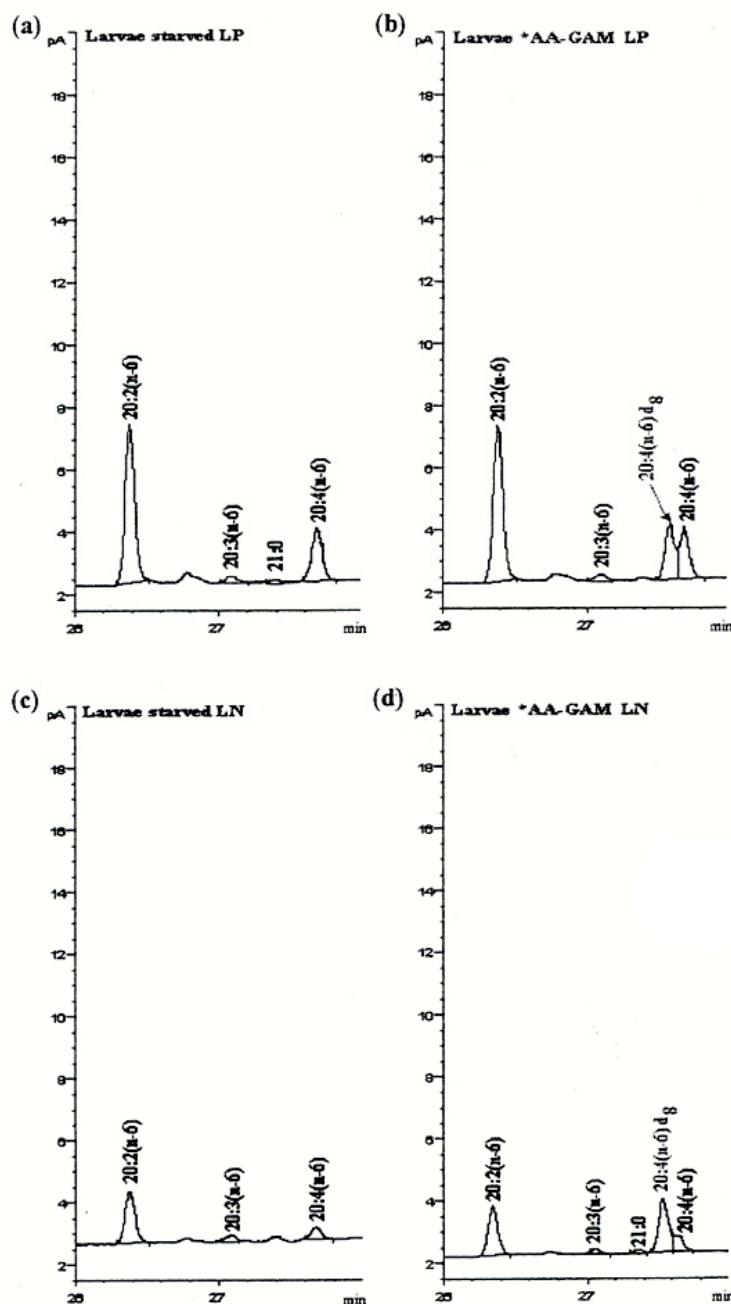


Figure 4. Partial chromatograms of FAMES prepared from larvae of *V. pullastra* corresponding to retention time between 26 and 28 min. Figure shows the incorporation of 20:4(n-6)d₈ in polar (b) and neutral (d) lipids in larvae fed with microcapsules with respect to starved larvae (a) and (c).

proved by an accumulation of yellow fluorescence (the dye color) inside the larva (Fig. 1). A sequence of photographs taken throughout a period of 20 min showed the decrease of yellow fluorescence in the digestive gland of a larva fed with microcapsules, due to digestion (Fig. 2).

Growth and Survival

Throughout the 7-day experiment, larvae were sampled with the daily water renewal to determine growth (anterior-posterior shell length) and survival. Growth and survival were similar for the

batches fed either microalgae supplemented with microcapsules or the microalgal diet (Fig. 3).

Fatty Acid Composition of *AA-GAM

The mean fatty acid compositions of *AA-GAM are listed in Table 1. The fatty acid profile of microcapsules fabricated with 50 μL of olive oil and 5 mg of deuterated arachidonic acid 20:4 (n-6)- d_8 showed a predominance of 18:1(n-9) ($65.7 \pm 0.31\%$), 16:0 ($10.8 \pm 0.07\%$), 18:2(n-6) ($10.1 \pm 0.33\%$), and 20:4(n-6)- d_8 ($5.4 \pm 0.24\%$). A single microcapsule contained 3.8 pg total fatty acids.

Dietary Fatty Acid Supply

The diet consisting of *AA-GAM exclusively was used in the 24-h experiment and supplied 60 $\text{GAM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, which corresponded to 29.86 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ for the 18:1(n-9) and 2.43 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ for 20:4(n-6)- d_8 (Table 1).

Table 2 shows the fatty acid composition of the two different diets (algal diet and *AA-GAM-supplemented diet) used in the 7-day experiment. The first supplied 7.77 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ of 18:1(n-9) and the second supplied 10.71 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ of 18:1(n-9) and 0.24 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ of 20:4(n-6)- d_8 .

Assimilation of Microcapsules in the 24-h Experiment

The FID-CG analysis allowed the separation and the quantification of deuterated *AA in polar and neutral lipids of larvae (Fig. 4). Larvae fed *AA-GAM exclusively showed incorporation of 20:4(n-6)- d_8 in polar and neutral lipid fractions (0.10 and 0.12 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$, respectively). The amount of the major fatty acid in olive oil, 18:1(n-9), also increased in neutral and polar lipids when compared with that of starved larvae: 1.08 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ versus 0.33 in neutral lipids and 0.66 $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$ versus 0.28 in polar lipids (Fig. 5a). Incorporation yield percentages of 20:4(n-6)- d_8 were

nearly equal in both lipid fractions (4.30% for polar lipids and 4.80% for neutral lipids), whereas for 18:1(n-9) they were 2.53% and 1.31% for neutral and polar lipids, respectively (Fig. 5b).

Fatty Acid Composition of Larvae Fed with Different Diets

Larvae fed with *AA-GAM-supplemented diet showed an increase in the incorporation of the two monitored fatty acids [20:4(n-6)- d_8 and 18:1(n-9)] in both lipid fractions when compared with those fed the microalgal diet (Fig. 6).

With regard to 20:4(n-6)- d_8 , incorporation profiles were similar in both lipid fractions throughout the 7-day experiment (16.3% for neutral lipids and 16.8% for polar lipids between days of culture 18 and 19). Assimilation percentages were higher during the early days of the culture and decreased in the late days from 16.3 to 5.6% in neutral lipids and from 16.7 to 6.1% in polar lipids (Fig. 7).

Incorporation of 18:1(n-9) was better in neutral than in polar lipids. Throughout the experience, the incorporation yield decreased in both fractions, although the phenomenon was more pronounced in polar lipids (Fig. 7).

The lipid content, the percentage of neutral and polar fractions and the fatty acid composition of larvae were similar in both 7-day experiments (Table 3). Supplementation with microcapsules did not affect the incorporation of the essential PUFA provided by microalgae. However, larvae fed microcapsules appeared to have a higher FAME content if compared with larvae fed microalgae only.

DISCUSSION

Numerous artificial particles have been tested to supplement or partially replace the living algal diet for mollusks. These included yeast (Epifanio 1979), flour (Albentosa et al. 1999), dried algae

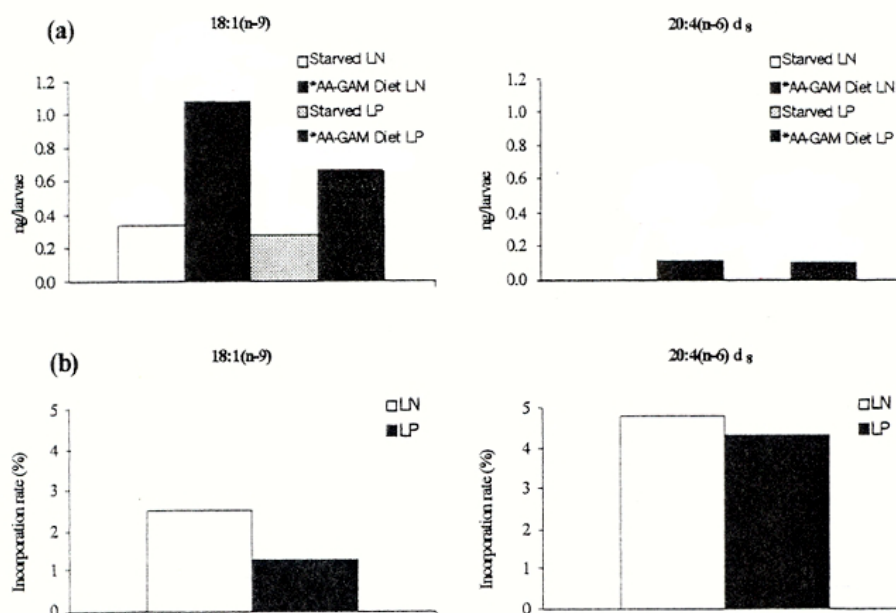


Figure 5. Bar diagrams showing the incorporation of both traced fatty acids in experiment 1. In (a), comparison of their contents as neutral and polar lipids in starved larvae and those fed *AA-GAM, expressed in $\text{ng} \cdot \text{larva}^{-1}$. In (b), incorporation rates as neutral and polar lipids in larvae fed *AA-GAM, expressed in percentages. In all cases, $n = 1$.

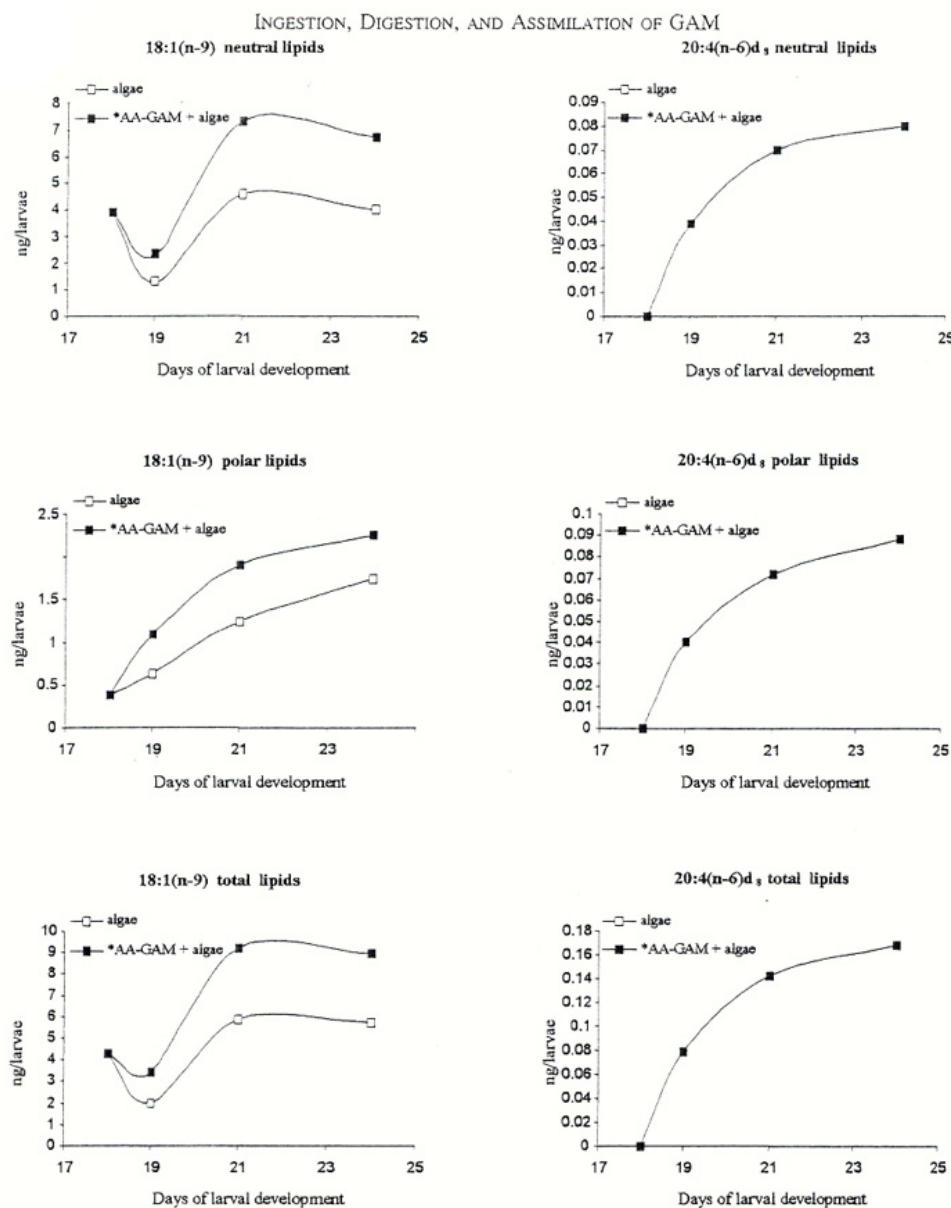


Figure 6. Dynamics of 18:1(n-9) and 20:4(n-6)d₃ in neutral, polar, and total lipids of larvae fed microalgae and *AA-GAM + microalgae during experiment 2.

(Laing & Millican 1991), emulsions, and liposomes (Coutteau et al. 1996, Caers et al. 1999, 2000, Soudant et al. 2000). Development of particles like gelatin-acacia spraybeads (Buchal & Langdon 1998) was mostly devoted to identifying essential molecules and to understanding their metabolism. In this article, we report data on the incorporation efficiency of the essential PUFA AA using GAM. Because mollusks contain AA in their corporal fatty acid, we incorporated deuterated AA (*AA), which can be easily discerned from the natural one by direct GC analysis, allowing a good estimation of its assimilation. This straightforward methodology avoids the use of radioactivity and its additional measure-

ments. Indeed, it may be applied to other essential fatty acids. Although deuterated metabolites of AA were not detected in our study, their determination is possible with this methodology.

Small-scale GAM fabrication is easy and suitable for experimental studies on metabolism, in particular for lipids, which are easily encapsulated. Olive oil was chosen as lipidic support because its composition is very simple. Oleic acid (OA) represents 65% of the total fatty acid present in olive oil. Moreover, olive oil lacks most very long-chain PUFA that are essential for marine mollusks (Trider & Castell 1980, Enright et al. 1986, Soudant et al. 1996). Therefore, the fatty acids from this oil would not interfere

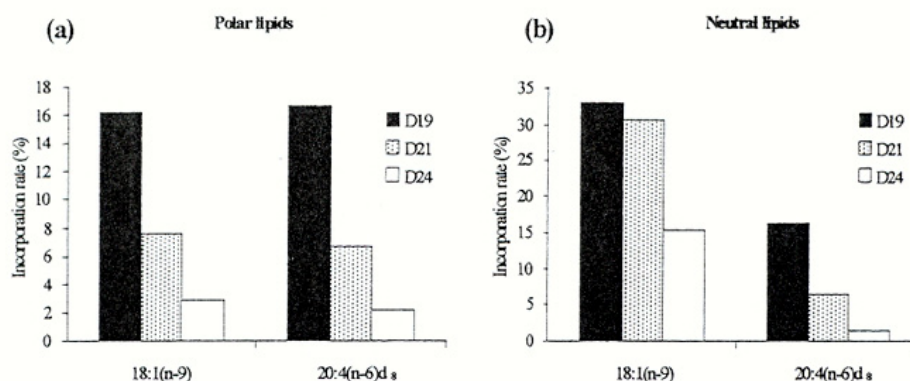


Figure 7. Incorporation rates of 18:1(n-9) and 20:4(n-6) d_8 in polar and neutral lipids of larvae fed with *AA-GAM + microalgae. ($n = 1$).

with larval development. The size of GAM obtained was compatible with mollusks' ingestion and they did not show harmful effect on larvae. On short-term observation (7 days), no deleterious effect was observed on growth. Growth and larval mortality were similar both in the presence and in the absence of GAM in our experiments.

The gradual disappearance of the fluorescent labeling observed in the digestive system of larvae (Fig. 2) was probably due to the digestion and assimilation of microcapsules by the larvae. In previous studies, Sudan red-stained GAM faded in the stomach and digestive diverticula of *Crassostrea virginica* larvae during the early 24 h after feeding, and disappeared completely within 48 h (Chu et al. 1982). Also, *Crassostrea gigas* spat were demonstrated to assimilate ^{14}C -labeled lipids incorporated in corn oil GAM (Knauer & Southgate 1997c).

Digestion and assimilation were eventually confirmed by tracing the deuterated arachidonic acid supplied by *AA-GAM. Results showed that *V. pullastra* larvae were able to incorporate this fatty acid into their endogenous lipids as both neutral and polar fatty acids. The results obtained in both 24-h and 7-day experiments established incorporation of 20:4(n-6)- d_8 , which could only be detected in larvae if *AA-GAM had been assimilated. How-

ever, larvae fed with *AA-GAM also showed an increase of OA, the other tracer fatty acid of GAM, in both neutral and polar lipids when compared with those starved or fed algae.

Contrary to neutral lipids, which may correspond to transient storage of ingested food, polar lipids are mostly located in membranes. Thus, incorporation in polar lipids better indicates true assimilation in both experiments. These results confirmed ingestion, digestion and assimilation of the fatty acids furnished by GAM.

With regard to the second experiment, it is noteworthy that essential PUFAs supplied by algae were found to be accumulated at the same level in neutral and polar lipids of larvae regardless of the diet. This shows that the incorporation of PUFA provided by the algae was not modified by the microcapsules, probably meaning that the amount of algae filtered by the larvae did not decrease by the presence of GAM. During the time course of this experiment, the polar lipid content increased continuously, which resulted in a regular growth. The neutral lipid content showed a clear drop between day 18 and 19 and then tended to reach a maximum at day 21. This may suggest the existence of a high energetic demand at this point of the larval development.

Fatty acid incorporation rates were observed to vary depending

TABLE 3.
Dynamics of the essential PUFAs and the total FAMES in polar and neutral lipids during experiment 2.

	18 Day ^a	19 Day		21 Day		24 Day	
	Algae	Algae	Algae + *AA-GAM	Algae	Algae + *AA-GAM	Algae	Algae + *AA-GAM
Polar lipids							
20:4 (n-6)	0.378	0.453	0.595	0.731	0.922	1.105	0.982
20:5 (n-3)	0.552	1.160	1.349	2.381	2.679	3.506	3.397
22:6 (n-3)	2.744	3.474	4.284	6.942	7.396	9.574	10.109
Total FAME (ng/larvae)	13.939	19.378	24.951	37.501	44.109	51.362	53.533
Neutral lipids							
20:4 (n-6)	0.316	0.298	0.304	0.963	1.095	1.054	1.119
20:5 (n-3)	3.875	1.182	1.124	4.136	4.341	4.792	5.302
22:6 (n-3)	2.437	1.324	1.418	4.232	4.403	4.163	5.073
Total FAME (ng/larvae)	53.935	18.541	21.209	62.576	71.264	56.544	69.745
Total lipids							
Total FAME (ng/larvae)	67.874	37.919	46.16	100.077	115.373	107.906	123.278
Percent neutral lipids	79.463	48.896	45.947	62.528	61.768	52.401	56.575

^a Data are expressed as mean for three analysis.

on the fatty acid supplied, as well as on the stage of larval development. OA incorporation was mainly observed in neutral lipids whereas *AA was equally distributed in neutral and polar lipids. OA is a monounsaturated fatty acid, thought to play a mainly energetic role in the reserve lipid fraction. The equal distribution of *AA in polar and neutral lipids is more surprising since, like vertebrates, some marine bivalves (*Pecten maximus*) have shown a preferential incorporation of AA in polar lipids, especially in the phosphatidyl inositol class (Soudant et al. 1998). However in *V. pullastra*, the natural AA supplied by the food was found at a similar level in neutral and polar lipids of 24-day-old larvae. The preferential location of arachidonic acid in polar lipids may be species specific. Furthermore, it is known that the fatty acid composition of diet is largely reflected in neutral lipid composition and to a lesser extent in polar lipids of animals. This is because polar lipids are regulated according to the needs of structural maintenance of membranes. Fatty acids supplied by the food would be first incorporated in neutral lipids and then, depending on the needs, transferred to polar lipids. The percentage of AA in polar lipids of mollusks fed with algae tended to decrease in the course of the experiment, perhaps because those needs were satisfied by the algae or, maybe, the needs of the larvae just dropped naturally with development. This would also explain the weak incorporation of *AA in polar lipids in the case of larvae fed with *AA-GAM.

OA and *AA incorporation in both neutral and polar lipids was high during the early days of the experience but decreased toward the later days. These data coincided with the fact that the amount of neutral and polar lipids per larva leveled off between days 21 and 24, corresponding to a decrease in growth rate and lower biosynthesis needs. Moreover, the decrease of the natural AA percentage in polar fatty acids and its stable percentage in neutral lipids may explain the decrease of incorporation of tracer fatty acids from

GAM. It is during this period that larvae are ready to undergo metamorphosis and change into spat.

Comparing the values of incorporation of both fatty acids supplied by GAM between experiments, we observed that incorporation increased in the second experiment. This may be explained by the presence of microalgae in the second experiment, which facilitated the retention of artificial GAM either by favoring the filtration or by adhesion of GAM on algae. Similar results were obtained by Knauer and Southgate (1997b), who reported an efficiency increase from 57–80% when *Dunaliella* was added to GAM.

An appropriate dosage of lipid components incorporated in microcapsules could be useful as a nutritional supplement for lipid-poor microalgal diets. The possibility of using microcapsules containing labeled fatty acids also allows us to trace the molecules and to study their distribution and possible metabolic conversion to structural and reserve lipids. This would contribute to go deeply into both energetic and structural needs for fatty acids in molluscan larval development, and to design nutritionally optimal lipidic diets to obtain spat of good quality.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a financial aid from the Secretaría de Estado de Universidades, Investigación y Desarrollo, Plan Nacional I + D, and Project MAR96-1876. A part of this study was supported by a grant of the Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura of the Xunta de Galicia, Spain, to S. N. The authors thank J. F. Samain and the colleagues of IFREMER, Centre Brest, for supplying their theoretical and practical aid. The authors would like to thank warmly the technical staff of CIMA, Ribadeo, for their generous work and technical assistance.

LITERATURE CITED

- Albentosa, M., M. J. Fernandez-Reiriz, A. Perez-Camacho & U. Labarta. 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232:23–27.
- Buchal, M. A. & C. J. Langdon. 1998. Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes 1853). *Aquacult. Nutri.* 4:263–274.
- Caers, M., P. Coutteau & P. Sorgeloos. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170:307–322.
- Caers, M., P. Coutteau & P. Sorgeloos. 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as a emulsion or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 186:157–171.
- Coutteau, P. & P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.* 11:467–476.
- Coutteau, P. & P. Sorgeloos. 1993. Substitute diets for live algae in the intensive rearing of bivalve mollusks—a state of the art report. *World Aquacult.* 24:45–50.
- Coutteau, P., M. Caers, K. Curé & J. Gajardo. 1996. Supplementation of lipid emulsions to algal diets in the hatchery rearing of bivalves. In: J. Gajardo & P. Coutteau, editors. Improvement of the commercial production of marine aquaculture species. Proc. Workshop on fish and mollusc larviculture, Puerto Montt, Chile, pp. 145–154.
- Chu, F. L. E., K. L. Webb, D. Hepworth & W. Roberts. 1982. The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 2:29–34.
- Chu, F. L. E., L. W. Kenneth, D. A. Hepworth & B. B. Casey. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. *Aquaculture* 64:185–197.
- Enright, C. T., G. F. Newkirk, J. S. Craigie & J. D. Castell. 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96:1–13.
- Epifanio, C. E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* 16:1–12.
- Hennion, M. C., J. C. Thiebaut, R. Rosset, P. Scribe, J. C. Marty & A. Saliot. 1983. Rapid semi preparative class preparation of organic compounds from marine lipids extracts by high-performance liquid chromatography and subsequent quantitative analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 280:351–362.
- Holland, D. L. 1978. Lipids reserves and energy metabolism in the larvae of benthic invertebrates. *Biochem. Biophys. Perspect. Mar. Biol.* 3:85–113.
- Jones, D. A., J. G. Munford & P. G. Gabbott. 1974. Microcapsules as artificial particles for aquatic filter feeders. *Nature (Lond.)* 247:233–235.
- Knauer, J. & P. C. Southgate. 1997a. Evaluation of microencapsulated squid oil as a substitute for live microalgae fed to Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *J. Shellfish Res.* 16:137–141.
- Knauer, J. & P. C. Southgate. 1997b. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalga and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *J. Shellfish Res.* 16:447–453.

- Knauer, J. & P. C. Southgate. 1997c. Assimilation of gelatin-acacia microencapsulated lipid by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Aquaculture* 153:291-300.
- Kreeger, D. A., A. J. S. Hawkins & B. L. Bayne. 1996. Use of dual-labeled microcapsules to discern the physiological fates of assimilated carbohydrate, protein carbon, and protein nitrogen in suspension-feeding organisms. *Limnol. Oceanogr.* 41:208-215.
- Laing, I. & P. F. Millican. 1991. Dried algae diets and indoor nursery cultivation of Manila clam juveniles. *Aquaculture* 95:75-97.
- Langdon, C. J. & M. J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 61:431-448.
- Langdon, C. J. & C. A. Siegfried. 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture* 39:135-153.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal & J. F. Samain. 1992. Change in the fatty composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163:221-234.
- Metcalfe, L. D. & A. A. Schmitz. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analyt. Chem.* 33:363-364.
- Numaguchi, K. & J. A. Nell. 1991. Effects of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture* 94:65-78.
- Robert, R. & P. Trintignac. 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquat. Living Resour.* 10:315-327.
- Rodriguez, J. L., J. Moal, J. F. Samain, F. Delaunay & Y. Marty. 1992. Mise au point de microcapsules lipidiques pour l'étude des besoins en acides gras des larves de bivalves. *Océanis* 18:227-234.
- Soudant, P., J. Moal, Y. Marty & J. F. Samain. 1996. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205:149-163.
- Soudant, P., Y. Marty, J. Moal, H. Masski & J. F. Samain. 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 121A:279-288.
- Soudant, P., M. V. Sanles, C. Quere, J. R. Lecoz, Y. Marty, J. Moal, J. F. Samain & P. Sorgeloos. 2000. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 184:315-326.
- Southgate, P. C. 1988. Use of microencapsulated diets in the culture of giant clam larvae. In: J. W. Copland & J. S. Lucas, editors. Giant clams in Asia and the Pacific, ACIAR Monograph No. 9, pp. 155-160.
- Trider, D. J. & J. D. Castell. 1980. Effects of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.* 110:1303-1309.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

En relación a la calidad ovocitaria se puede concluir:

1. -Que existe una relación positiva entre un desarrollo larvario óptimo y su contenido en ácido linoleico en los lípidos de reserva (ácido graso mayoritario de la serie $\omega 6$).

2. -Un exceso de EPA y DHA (ácidos grasos mayoritarios de la serie $\omega 3$) en las reservas ovocitarias y, por lo tanto procedentes de la dieta de los progenitores, podría afectar negativamente al desarrollo larvario, inhibiendo procesos lipogénicos en los que se encuentran implicados enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos de membrana.

3. -Ambas conclusiones nos permiten sugerir que la relación $\omega 3/\omega 6$ óptima en las reservas neutras de ovocitos de almeja babosa, se podría encontrar en un intervalo de 1,5 a 2,0. El incremento de dicha relación incide negativamente en el éxito del desarrollo larvario.

En relación a la calidad larvaria se puede concluir:

4. -El paso de ovocito fecundado a larva D requiere la transformación de sus biomembranas, siendo los ácidos grasos constituyentes más necesarios los que más se incrementan en el proceso (ácido palmítico, DHA, ácido esteárico y oleico).

5. -El descenso del EPA, más acusado en lípidos de reserva en períodos de no alimentación (lecitotróficos) y en lípidos de membrana en períodos de ayuno o de déficit en sus reservas lipídicas, se puede deber a su doble papel. Uno como sillar estructural en la construcción de fosfolípidos de membrana (como tal o como sustrato para la formación de DHA), y otro como combustible secundario generador de ATP y poder reductor en etapas de alta demanda biosintética o, en casos de ayuno, aportando la energía necesaria para los procesos vitales.

6. -En larvas de almeja babosa no se observa un claro período mixotrófico. Así las larva D ya crecen (incrementan sus ácidos grasos de membrana) y almacenan reservas (incrementan sus ácidos grasos neutros) en el período de veliger temprano, característica de una asimilación de alimento exógeno. Las larvas de la vieira reflejan un comportamiento distinto, observándose un período mixotrófico entre el día 2 y el día 5, caracterizado por una pequeña pérdida de AGTs en lípidos polares (intensa reestructuración de biomembranas) y sobre todo, una importante pérdida en AGTs en lípidos neutros.

7. -Las larvas de la almeja babosa priorizan su desarrollo larvario en crecer (larvas magras), mientras que en la vieira la estrategia es la de acumular (larvas grasas). Esto es coincidente con que el perfil de ácidos grasos de la dieta microalgal aportada, se refleja en los % de incorporación de los mismos en lípidos neutros (reservas) de las larvas de la vieira, mientras que en la almeja babosa, el perfil de ácidos grasos de la dieta se asemeja al % de incorporación de estos ácidos grasos en lípidos polares (membranas).

En relación a la calidad nutricional se puede concluir:

8. -La calidad y cantidad de alimento repercuten en las tasas de crecimiento y en el tiempo en que la larva está lista para metamorfosear.

9. -Las microcápsulas lipídicas pueden ser una herramienta de trabajo válida para la incorporación de aceites o grasas con distintos perfiles en ácidos grasos y su suplementación a la dieta microalgal al confirmarse la ingestión, digestión y asimilación, tanto en lípidos estructurales, como de reserva del ácido araquidónico deuterado, incorporado en microcápsulas de aceite de oliva.

10. -También es factible el uso de las microcápsulas de gelatina acacia en estudios del metabolismo lipídico de ácidos grasos en larvas de bivalvos marinos, al poder rastrear tanto la incorporación del mismo, como su posible biotransformación (elongación y/o desaturación) por la maquinaria enzimática propia de organismo.

VII.-BIBLIOGRAFÍA

VII.-BIBLIOGRAFÍA

Abella E; Martínez M; Sebe MP; Alcalde A; Mosquera P; Parada JM. 2001. Experiencia de cultivo de almeja babosa (*Venerupis pullastra*): preengorde y engorde en la Ría de Arousa, Galicia. Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas, 4:118-123.

Ackman RG; Tocher CS y Lachlan J. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. J. Fish. Res. Board. Canada, 25: 1603-1620.

Albentosa M; Labarta U; Pérez-Camacho A; Fernández-Reiriz MJ y Beira R. 1994. Fatty acid composition of *Venerupis pullastra* spat fed on different microalgae diets. Comp. Biochem. Physiol., 108A (4): 639-648.

Albentosa M; Labarta U; Fernández-Reiriz MJ y Pérez-Camacho A. 1996b. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. Comp. Biochem. Physiol., 113 (A): 113-119.

Albers CS; Kattner G; Hagen W. 1996. The compositions of wax esters, triacylglycerols and phospholipids in Arctic and Antarctic copepods: evidence of energetic adaptations. Mar. Chem., 55: 347-358.

Arnáiz R y De Coa A. 1978. Artes de marisqueo usadas en la ría de Arosa. Publicaciones del Plan de Explotación Marisquero de Galicia.

Bayne BL. 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). Ophelia, 2: 1-47.

Bayne BL. 1976. Marine mussels: Their ecology and physiology. Cambridge University Press. Cambridge.

Bayne BL. 1983. Physiological ecology of mussel larvae. The Mollusca. Vol. 3. Development, NH Verdonk, JAM Van den Biggelaar y AS Tompa (ed). Academic Press, New York: 299-343.

Ben-Amotz A; Fishler R y Shneller A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifer with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.*, 95: 31-36.

Beninger PG y Stephan G. 1985. Seasonal variations in the fatty acids of the triacylglycerols and phospholipids of two populations of adult clam (*Tapes decussatus* L. and *Tapes philippinarum*) reared in a common habitat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 591-601.

Bensadoun A y Weinstein D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analyt. Biochem.*, 70: 241-250.

Blades y Eckelbarger PI. 1986. Aspects of internal anatomy and reproduction in the Copepoda. National Museum of Canada. *Syllogeus* 58: 26-50.

Brenner RR. 1971. The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 6: 567-575.

Brown MR; Jeffrey SW y Garland CD. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Reports*, 205.

Brown MR. 1991. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99.

Caers M; Coutteau P; Lombeida P y Sorgeloos P. 1998. The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. *Aquaculture*, 162 (3-4): 287-299.

Caers M; Coutteau P y Sorgeloos P. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L) spat. *Aquaculture*, 170: 307-322.

Castell JD. 1983. Fatty acid metabolism in crustaceans. *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Baton Rouge, Louisiana.*

Cerviño Otero A. 2005. Estudio del ciclo reproductivo de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) en dos poblaciones de la costa gallega: Camariñas y O Grove. Trabajo de Investigación para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela.

Cerviño Otero A; Carballal MJ; Martínez D; García A; Cerviño Eiroa A. 2005. Efectos de los procesos de 1ª maduración reproductiva en el preengorde de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), la almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). Actas X Congreso Nac. Acuicult., Tomo II: 604-605.

Cho HP; Nakamura MT; Clarke SD. 1999a. Cloning, expression and fatty acid regulation of the human delta-5-desaturase. J. Biol. Chem., 274: 37335-37339.

Cho HP; Nakamura MT; Clarke SD. 1999b. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6-desaturase. J. Biol. Chem., 274: 471-477.

Christie WW. 1982. The structure, chemistry and occurrence of lipids. Lipid analysis. R. Maxwell (ed). Pergamon Press Ltd. Oxford, 1-16.

Chu FLE; Dupuy JL y Webb KL. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. Aquaculture, 29: 241-252.

Chu FLE; Kenneth W; Hepworth A y Casey B. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. Aquaculture, 64: 185-197.

Chu FLE y Greaves J. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. Marine Biology, 110 (2): 229-236.

Clarke SD. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 281: G865-G869.

Coutteau P y Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.*, 11: 467-476.

Cowey CB; Owen JM; Adron JW; Middleton C. 1976. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot (*Scophthalmus maximus*). *British Journal of Nutrition*, 36 (3), 479-486.

Da Costa F. 2004. Optimización del cultivo de lingueirón vello (*Solen marginatus* Pennant, 1777): en las fases de criadero y medio natural. Trabajo de Investigación para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela.

Darriba S; Martínez D; Guerra A. 2002. The razor clam *Ensis arcuatus*: perspectives for hatchery outgrowing culture. *European Aquaculture Society. Special publication*, 32:198-199.

De Moreno JE; Moreno VJ y Brenner RR. 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*, 11: 561-566.

De Pauw y Persoone G. 1988. Microalgae for aquaculture. *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, MA & Borowitzka, LJ (ed), 197-221. Cambridge University Press, Cambridge.

Delaunay F. 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L) au cours du développement larvaire. Thèse de doctoral de L'Université de Brest.

DeWille JW y Farmer SJ. 1992a. Postnatal dietary fat influences mRNAs involved in myelination. *Dev. Neurosci.* 14: 61-68.

DeWille JW y Farmer SJ. 1992b. Quaking phenotype influences brain lipid related mRNA levels. *Neurosci Lett.* , 141(2): 195-8.

Dorange G y Le Pennec M. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103 (3): 339-348.

Dreywood R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. (Anal. ed)*, 18: 499.

Duplus E; Glorian M y Forest C. 2000. Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 30749-30752.

Enright CT; Newkirk GF; Craigie JS y Castell JD. 1986a. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 1-13.

Enright CT; Newkirk GF; Craigie JS y Castell JD. 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 15-26.

Epifanio CE. 1976. Culture of bivalve molluscs in recirculating systems: Nutrition. Ed KS Price, W Shaw, K Dunberg. *Proceeding 1st International Conference on Aquaculture Nutrition*, 173-194.

Epifanio CE. 1979. Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L). *Aquaculture*, 18: 1-12.

Falk-Petersen S; Hagen W; Kattner G; Clarke A; Sargent J. 2000. Lipids, trophic relationships and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 57: 178-191.

Fischer-Piette E y Metivier B. 1971. Révision des Tapetinae (Mollusques Bivalves). Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., París, 71: 1-106.

Gabbott PA. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine mollusca. The Mollusca. Environmental biochemistry and physiology. (K. M. Wilbur, ed), Academic Press. New York., 165-219.

Garbay B; Boiron-Sargueil F; Shy H; Chbihi T; Jiang HY; Kamholz J; Cassagne C. 1998. Regulation of Oleoyl-CoA synthesis in the peripheral nervous system: Demonstration of a link with myelin synthesis. Journal of Neurochemistry, 71 (4): 1719-1726.

García A; Cerviño A y De Coó A. 2005. Potencial de crecimiento y resultados de mortalidad, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), en diversos sistemas en las Rías Bajas de Galicia, con especial atención a los factores que interactúan en su evolución. Actas X Congreso Nac. Acuicult. Valencia. Tomo II: 618-619.

Garland M; Sacks F; Coldit G; Rimm E; Sampson L. 1998. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. Am. J. Clin. Nutr., 67: 25-30.

Gavino GR y Gavino V. 1991. Rat liver outer mitochondrial carnitine palmitoyltransferase activity towards long-chain polyunsaturated fatty acids and their CoA esters. Lipids, 26: 266-270.

Graeve M. 1993. Umsatz und Verteilung von Lipiden in arktischen marinen Organismen unter besonderer Berücksichtigung unterer trophischer Stufen. Reports on Polar Research, 124: 1-141.

Gruffyd LD y Beaumont AR. 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia). Helgoländer wiss. Meeresunters., 20: 486-497.

Guerra A; Nóvoa S; Besada M; Búa I; Lastres M; Fernández J y Asela R. En prensa. Crecimiento y composición bioquímica de semilla de almeja japonesa (*Tapes philippinarum*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*), obtenida en criadero y cultivada en diferentes sistemas de preengorde y en parque de cultivo. Actas XI Congreso Nac. Acuicult. Vigo.

Hadley NF. 1985. The adaptive role of lipids in biological systems. Wiley, New York.

Hagen W; Van Vleet ES; Kattner G. 1996. Seasonal lipid storage as overwintering strategy of Antarctic krill. Mar. Ecol. Prog. Ser., 134: 85-89.

Harrington GW; Beach DH; Dunham JE; Holz GG. 1970. The polyunsaturated fatty acids of marine dinoflagellates. J. Protozool., 17: 213-219.

Heras H y Pollero RJ. 2002. Lipoproteins from plasma and perivitelline fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. Biocell., 26 (1): 111-118.

Herrero C; Angeles C; Fabregas J y Abalde J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. Aquacult. Eng., 10: 99-110.

Hertzberg GR; Skinner C y Levy R. 1992. Conference in Third International on essential fatty acids and eicosanoids. Adelaine, Australia. Poster 31.

Hess HH; Lees MB y Derr JE. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. Anal. Biochem., 85: 295-300.

Hillgartner FB; Salati LM y Goodridge AG. 1995. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.*, 75: 47-76.

Hodge J; Sanders K y Sinclair AJ. 1993. Differential utilization of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in human plasma. *Lipids*, 26 (6): 525-531.

Holland DL y Spencer BE. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal Mar. Biol. Ass. UK.*, 53: 287-298.

Ibeas C; Izquierdo MS y Lorenzo A. 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 127 (2-3): 177-188.

Ideta R; Seki T; Adachi K y Nakayama Y. 1998. The isolation and characterization of androgen-dependent genes in the flank organs of golden Syrian hamsters. *Dermatology*. 196: 47-50.

James CM; Al-Hinty S y Salman AE. 1989. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77: 337-351.

Joseph JD. 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid. Res.*, 21: 109-153.

Jump DB y Clarke SD. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 19: 63-90.

Kaestner KH; Ntambi JM; Kelly TJ; Jr y Lane MD. 1989. Differentiation-induced gene expression: a second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* 264: 14755-14761.

Kanazawa A; Teshima S; Ono K. 1979a. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B: 295-298.

Kanazawa A; Teshima S; Ono K; Chalayondeja K. 1979b. Biosynthesis of fatty acids from acetate in the prawns, *Panaeus monodon* and *Penaeus merquiensis*. *Mem. Fac. Fish Kagoshima Uni.*, 28: 21-26.

Kates K y Volcani BE. 1966. Lipid components of diatoms. *Biochim. Biophys. Acta*, 116: 264-278.

Kattner G. 1991. Marine Lipide nördlicher Meeresgebiete unter besonderer Berücksichtigung der calanoiden Copepoden. *Habil thesis, University of Bremen*.

Kim YC y Ntambi M. 1999. Regulation of stearyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266(1): 1-4.

Kluytmans JH; Boot JH y Oudejans RCHM. 1985. Fatty acid synthesis in relation to gametogenesis in the mussel (L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 959-963.

Knauer J y Southgate PC. 1997a. Evaluation of microencapsulated squid oil as a substitute for live microalgae fed to Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *J. Shellfish Res.*, 16: 137-141.

Knauer J y Southgate PC. 1997b. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalga and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *J. Shellfish Res.*, 16: 447-453.

Laing I y Millican PF. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54: 245-262.

Lakshmanan MR; Nepokroeff CM y Porter JW. 1972. Control of the synthesis of fatty acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3'5 cyclic monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69: 3516-3519.

Langdon CJ y Waldock MJ. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spot. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 61: 431-448.

Langdon CJ y Siegfried CA. 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filters feeders. Aquaculture, 39: 135-153.

Laux T y Schweizer M. 1990. Dietary-induced pretranslational control of rat fatty acid synthase. Biochem. J., 266: 793-797.

Le Pennec M. 1981. Less méthodes expérimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins. Haliotis, 11: 139-155.

Lee RF; Hirota J; Barnett AM. 1971a. Distribution and importance of wax esters in marine copepods and other zooplankton. Deep-Sea Res., 18: 1147-1165.

Lee RF. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. In: Advances in comparative and environmental physiology. R. Gille, Ed. Springer- Verlag, London., 7: 187-208.

Lee RF y Heffernan PB. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). J. Shellfish Res., 10, 1: 203-206.

Lee RF; Hagen W; Kattner G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser., 307: 273-306.

Leonard A; Kelder B; Bobik EG; Chuang L; Parker-Barnes JM; Thurmond JM; Kroeger PE; Kopchick JJ; Huang Y y Mukerji P. 2000. cDNA cloning and characterization of human D5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.*, 347: 719-724.

Lin DS; Connor WE; Spenler CW. 1993. Are dietary saturated, mono-unsaturated and polyunsaturated fatty acids deposited to the same extent in adipose tissue of rabbits?. *Am. J. Clin. Nutr.*, 58: 174-79.

Longo FJ. 1983. Meiotic maturation and fertilization. In: *The Mollusca*, Vol. 3, Development, N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar y A.S. Tompa (ed). Academic Press. New York: 50-89.

Loosanoff VL y Davis HC. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Advances in Marine Biology*. Acad. Press, New York.

Lowry OH; Rosenbrough NJ; Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Lucas A. 1976. La culture des mollusques ou conchyliculture. L'exploitation de la vie marine. *Océanographie biologique appliquée*. Paris. Ed. Masson, 229-258.

Lucas A. 1980. Problème de génétique, d'écophysiologie et de pathologie dans les éclosiers de Bivalves. *Oceanis*, 6(5): 511-533.

Lucas A y Rangel C. 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture*, 30: 369-374.

Lucas A. 1984. Développement contrôlé des Bivalves marins. *Haliotis*, 14: 143-158.

Lucas A; Chebab-Chalabi L y Aldana-Aranda D. 1986. Pasaje de l'endotrophie à l'exotrophie chez les larves de *Mytilus edulis*. Océanologique Acta, 9 (1): 97-103.

Lumley I. 2001. A critical assessment of chromatographic and calculation procedures used to quantitatively determine fatty acids. An Examination of Critical Points in the Analytical Procedure. MAFF Project AN0639. Report Prepared by: LGC. Queens Road. Teddington. TW11 0LY. UK.

Manzi JJ y Castagna M. 1989. Clam Mariculture in North America. Elsevier. Devel. Aquaculture and Fish. Sci., 19: 461.

Marsh JB y Weinstein DB. 1966. Simple charring method for determination of lipids. J. Lipid Res., 7: 574-576.

Martínez D; Nóvoa S; Ojea J y Álvarez LM. 2000. Larval rearing of razor clams *Solen marginatus* (Pennant, 1777), *Ensis siliqua* (Linné, 1758) and *Ensis ensis* (Linné, 1758). Abstracts Aquaculture Europe 2000. Niza. Francia.

Martínez D; Nóvoa S; Ojea J. 2001. Cultivos larvarios y postlarvarios de almeja fina (*Tapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*) en criadero. Actas VIII Congreso Nac. Acuicult., 304-306.

Martínez D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

Marty Y; Delaunay F; Moal J y Samain JF. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) during larval development. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 163: 221-234.

Matthews KR; Homer DB; Thies F; Calder PC. 2000. Effect of whole linseed (*Linum jositatissimum*) in the diet of finishing pigs on growth performance and on the quality and fatty acid composition of various tissues. Br. J. Nutr., 83: 637-43.

Mayzaud P. 1997. Spatial and life-cycle changes in lipid and fatty acid structure of the Antarctic euphausiid *Euphausia superba*. Battaglia B, Valencia J, Walton DWH (ed). Antarctic Communities: species, structure and survival. Proc 6th SCAR Symp. on Antarctic Biology, Cambridge University Press, Cambridge, 284-294.

Mazliak P. 1980. Formation des acides gras polyinsaturés dans le règne végétal. Ann. Nutr. Alim., 34: 189-206.

Metcalf LD y Schmitz AA. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. Anal. Chem., 33: 363-364.

Michaelson LV; Lazarus CM; Griffiths G; Napier JA y Stobart AK. 1998. Isolation of a $\Delta 5$ -Fatty Acid Desaturase gene from *Mortierella alpine*. J. Biol. Chem., 273: 19055-19059.

Mihara K. 1990. Structure and regulation of rat liver microsomal stearyl CoA desaturase gene. J. Biochem. 108: 1022-1029.

Montagu G. 1803. Británica. JS Hellis, Romocinad Sol by L. White. London.

Moon YS; Latasa MJ; Griffin MJ y Sul HS. 2002. Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. J. Lipid Res., 43: 691-698.

Mortensen SH; Borsheim KY; Rainuzzo JR y Knutsen G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt: Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 122: 173-185.

Nakamura MT y Nara TY. 2004. Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. Annual Review of Nutrition. 24: 345-376.

Napolitano GE y Ackman RG. 1993. Fatty acid dynamics in sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova Scotia. J. Shellfish Res., 121: 267-277.

Nascimento IA. 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. J. Cons. Int. Explor. Mer., 39: 134-139.

Nóvoa S; Martínez D; Ojea J; Blanco J; Bujan J; Rodríguez JL. 1999. Fabricación de microcápsulas a partir de aceites naturales (atún, caballa, bacalao y sardina) para su empleo como suplemento lipídico nutricional en los cultivos larvarios de almeja. Actas VII Cong. Nac. de Acuic., 361-366.

Nóvoa S; Martínez D; Ojea J; Soudant P; Samain J-F; Moal J; Rodríguez JL. 2002. Ingestion, digestion and assimilation of gelatin-acacia microcapsules incorporating deuterium labeled arachidonic acid by larvae of the clam *Venerupis pullastra*. Journal of Shellfish Research, 21(2): 649-658.

Ntambi JM; Buhrow SA; Kaestner KH; Christy RJ; Sibley E; Kelly TJ; Jr y Lane MD. 1988. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. J. Biol. Chem., 263: 17291-17300.

Ntambi JM. 1992. Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. J. Biol. Chem., 267: 10925-10930.

Numaguchi K y Nell JA. 1991. Effects of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Rougheley), larvae. Aquaculture, 94: 65-78.

Ojea J; Nóvoa S; Martínez D; Rodríguez JL. 1999. Evaluación de la calidad nutritiva del fitoplancton en tres sistemas de cultivo empleados en criaderos de moluscos. Actas del VII Cong. Nac. de Acuic., 317-322.

Owen JM; Adron JW; Middleton C y Cowey CB. 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* (L) and rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Lipids, 10: 528-531.

Parker RS y Selivonchick DP. 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 53: 215-228.

Pérez Camacho A; Román Cabello G y Torre Cervigón M. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). Bol. Inst. Espa. Oceanog., III (235): 215-268.

Pohl P. 1983. Lipids and fatty acids of microalgae. CRC Handbook of Biosolar Resources, 383-404.

Qi B; Beaudoin F; Fraser T; Stobart AK; Napier JA; Lazarus CM. 2002. Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ 9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. FEBS Lett. 510: 159-165.

Qiu X; Hong H; MacKenzie SL. 2001. Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium sp* involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. J. Biol. Chem., 276(34): 31561-6.

Reddy JK; Hashimoto T. 2001. Peroxisomal beta-oxidacion and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. Annu. Rev. Nutr., 21: 193-230.

Robinson A. 1992a. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. J. Shellfish Res., 11: 437-441.

Robinson A. 1992b. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): II. Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. J. Shellfish Res., 11: 443-447.

Rodríguez JL; Moal J; Samain JF; Delaunay y Marty Y. 1992. Mise au point de microcapsules lipidiques pour l'étude des besoins en acides gras des larves de bivalves. Océanis, 18: 227-234.

Román G. 1989. Efecto del ciclo reproductivo y acondicionamiento en el desarrollo larvario, fijación y posterior crecimiento de semilla de *Ostrea edulis* Linné 1758. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

Sargent JR; Henderson RJ. 1986. The biological chemistry of marine copepods. Lipids. IN: Corner EDS, O'Hara SCM (ed). Claredon. Oxford. 59-108.

Sargent JR. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage NR, Roberts RJ (ed), Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford.

Sargent JR; Bell MV; Bell JG; Henderson RJ; Tocher DR. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. Ceve G, Paltauf F (ed). Phospholipids characterization, metabolism and novel biological applications. American Oil Society Press. Champaign, IL, 248-259.

Sedano FJ. 1992. Contribución al estudio del metabolismo energético durante los desarrollos embrionario y larvario en *Mytilus galloprovincialis* Lamark. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

Sessler AM y Ntambi JM. 1998. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.*, 128: 923-926.

Soudant P. 1995. Les phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L). Relations avec la nutrition. Thèse de doctoral de L' Université de Brest.

Southgate PC. 1988. Use of microencapsulated diets in the culture of giant clam larvae. In: J. W. Copland & JS Lucas, editors. Giant clams in Asia and the Pacific, ACIAR Monograph. Nº 9: 155-160.

Southgate PC y Lou DC. 1995. Improving the n-3 HUFA composition of *Artemia* using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture*, 134: 91-99.

Sprecher H; Luthria DL; Mohammed BS; Baykousheva SP. 1995. Revaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Research*, 36: 2471-77.

Sprung M y Bayne BL. 1984. Some practical aspects of fertilizing the eggs of the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 41: 125-128.

Stubbs CD y Smith AD. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 779: 89-137.

Stukey JE; McDonough VM; Marin CE. 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.*, 265: 20144-20149.

Stumpf PK y Shimakata T. 1983. Biosynthesis and function of plant lipids. Thomson, WW.; Mudd BJ y Gibbs M., ed). Wavery Press, Baltimore.

Sukenik A; Carmeli Y y Berner T. 1989. Regulation of fatty acid composition by growth irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol., 25: 686-692.

Tocher DR y Dick JR. 1990. Incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in phospholipid classes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) cells. Comp. Biochem. Physiol., 96B: 73-79.

Tocher DR; Leaver MJ; Hodgson PA. 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. Prog. Lipid. Res., 37: 73-117.

Trider DJ y Castell JD. 1980. Effects of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). J. Nutr., 110: 1303-1309.

Uki N; Sigiura M y Watanabe T. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannaï*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 52: 1013-1023.

Valenzuela AM. 2004. Variación de las reservas energéticas de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) en relación a la gametogénesis. Tesis doctoral. Univ. de Vigo.

Villalba A; Carballal; MJ y López MC. 1993. Estudio del ciclo gonadal de tres especies de almejas, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*, de las rías gallegas. Actas IV Congreso Nac. Acuicult., 341-346.

Volkman JK; Jeffrey SW; Nichols PD; Rogers GI y Garland CD. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 128: 219-240.

Voss A; Reinhart M; Sankarappa S; Sprecher H. 1991. The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic acid to 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahe-xaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. J. Biol. Chem, 266: 19995-20000.

Wakil SJ; Stoops JK y Joshi VC. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. Annu. Rev. Biochem., 52: 537-579.

Waldock MJ y Nascimento IA. 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. Marine Biology Letters, 1: 77-86.

Waldock MJ y Holland DL. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. Lipids, 19: 332-336.

Walne PR. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* (L) Fishery Investigations, 25 (4), Ser. 2. Ministry of Agriculture, Fishery and Food.

Ward RJ; Travers MT; Vernon RG; Salter AM; Buttery PJ y Barber MC. 1997. The ovine stearoyl-CoA desaturase gene: cloning and determination of gene number within the ovine genome. Biochem. Soc. Trans., 25 (4): S673.

Watts JL y Browse J. 1999. Isolation and characterization of a delta 5-fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. Arch. Biochem. Biophys., 362: 175-182.

Watts JL y Browse J. 2000. A palmitoyl-CoA-specific delta 9 fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 272: 263-269.

Webb KL y Chu FLE. 1983. Phytoplankton as food source for bivalve larvae. Proc. 2nd Intern. Conf. on Aquaculture Nutrition, Spec., 2: 272-289.

Whyte JNC. 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids of cultured species. *Aquaculture*, 75: 193-203.

Whyte JNC; Bourne N; Ginther NG. 1990b. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.*, 106: 239-244.

Wilson J. 1887. On the development of the common mussel (*Mytilus edulis* L). *En Fifth Ann. Rep. Fish. Board Scotl.*, VI: 247-256.

Zhang L; Ge L; Parimoo S; Stenn K y Prouty SM. 1999. Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem. J.*, 340: 255-264.

Zhang L; Ge L; Tran T; Stenn K; Prouty SM. 2001. Isolation and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem. J.*, 357: 183-193.

Zheng Y; Prouty SM; Harmon A; Sundberg JP; Stenn KS y Parimoo S. 2001. Scd 3-a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics*, 71: 182-191.

Zhou S; Ackman RG; Morrison C. 1996. Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 326-332.

Zhou L y Nilsson A. 2001. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid. Res.*, 42: 1521-42.

Zhukova NV. 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from (¹⁴C) acetate in molluscs. *Biochem. Biophys. Acta*, 878: 131-133.

Zhukova NV. 1991. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Com. Biochem. Physiol.*, 100B: 4, 801-804.